Über einen neuartigen Esterasekomplex in der Leber des Karpfens

RENATE VÖCKS

1967

Fotodruck Franz Frank, 8 München 13, Zieblandstr. 39

Über einen neuartigen Esterasekomplex in der Leber des Karpfens

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Ludwig-Maximilians-Universität

zu München

vorgelegt

von

Renate Vöcks

aus

München

1967

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Berichterstatter: 1. Professor Dr. phil., Dr.h.c. E. Bamann
2. Professor Dr. phil., Dr.rer.nat.h.c.,
Dr. pharm.h.c. G.-M. Schwab

Tag der mündlichen Prüfung: 15.11.1967

Meinen Eltern

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546019_0059

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität München unter der Leitung seines Direktors, Herrn Professor Dr.Dr.h.c. Eugen Bamann, in der Zeit von Oktober 1964 - März 1967 angefertigt.

Meinem hochverehrten akademischen Lehrer danke ich für die Anregung zu der Arbeit und die großzügige Förderung meiner Untersuchungen ebenso sehr wie für sein stetes Wohlwollen und seine Hilfsbereitschaft.

Für die Hilfe bei der Beschaffung von Fischlebern, die mir die Durchführung der vorliegenden Arbeit mitermöglicht hat, danke ich sehr herzlich

Herrn Dr.G.KEIZ, Oberregierungsrat im Bayerischen Staatsministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten

und

Herrn Dr.M.BOHL, Betriebsleiter der Teichwirtschaftlichen Abteilung der Bayerischen Biologischen Versuchsanstalt in Wielenbach/Weilheim.

Inhaltsübersicht

A. Einführung 1

B. Ergebnisse der Untersuchung

I. Entscheidende Merkmale für die Charakterisierung des Enzyms 2

1) Spaltung von Tributyrin und Buttersäuremethylester

2) Charakterisierung des Enzyms mit Hilfe seiner stereochemischen Spezifität 4

3) Abhängigkeit des optischen Auswählens von der Menge der angewandten Enzymlösung 5

4) Einfluß von Wasserstoffionenkonzentration und Puffer auf das optische Auswählen 6

5) Die Wirkung von Metallsalzen auf die enzymatische Spaltung des rac. Mandelsäureäthylesters 8

6) Ableitung der stereochemischen Spezifität der "Metall-abhängigen" Esterase aus den Spaltungsversuchen mit den isomeren Estern 12

7) Variierung der Substratkonzentration, Einfluß von Zusätzen 16

8) Anreicherung des Enzyms und Auftrennung 19

9) Die Stabilität der "Metall-abhängigen" Esterase 23

10) Auftreten einer zweiten "nicht aktivierbaren" Esterase 23

11) Ableitung der stereochemischen Spezifität der "nicht aktivierbaren" Esterase aus den Spaltungsversuchen mit den isomeren Estern 26

II. Tabellarische Übersicht der Versuchsergebnisse 28

C. Diskussion der Ergebnisse

I. Ist in der Leber des Karpfens die Leberesterase mit Pankreaslipase vergesellschaftet ? 52

II. Die Rolle der Metallionen bei der enzymatischen Hydrolyse 52

III. Überlegungen zum Auftreten einer zweiten Esterase in "gealterten" Enzymlösungen 58

D. Methodik

1) Enzymmaterial 61

2) Versuchsansatz 64

3) Aufarbeitung des Versuchsansatzes 64

4) Methodik und Versuchsansatz mit den stereoisomeren Estern 65

E. Zusammenfassung 66

F. Literaturverzeichnis 69

A. Einführung

In einer Studie über die stereochemische Spezifität der Leberesterase von F i s c h e n , die der modernen zoologischen Systematik dienen kann, sind wir bei der Untersuchung und Charakterisierung des Leberenzyms des Karpfens, des Giebels und der Karausche auf Verhältnisse gestoßen, die sich nicht mit den bisherigen Kenntnissen über diese Enzymgruppe im Einklang befinden.

Wir sahen uns vor der Aufgabe, die völlig neuartigen Erscheinungen bezüglich der Stereospezifität des Enzymkomplexes, der Unterschiedlichkeit in der Aktivierbarkeit bzw. Hemmbarkeit durch Metallsalze, Komplexbildner und andere Zusätze zu studieren und dabei die Frage nach dem Vorhandensein eines einzigen, sich aber abwandelnden Enzyms oder mehrerer nebeneinander bestehender Esterasen zu klären.

In der nachstehenden Arbeit sind eine Reihe von Einzelfragen gelöst und ein befriedigendes Bild über das Verhalten, insbesondere die optische Spezifität, der Karpfenleberesterase entworfen worden.

B. Ergebnisse der Untersuchung

I. Entscheidende Merkmale für die Charakterisierung des Enzyms

1) Spaltung von Tributyrin und Buttersäuremethylester

Eine erste Charakterisierung des Enzymtyps der Karpfenleberesterase wurde aus dem Vergleich der Tributyrin-Spaltung (33) mit der Buttersäuremethylester-Spaltung (3,35) erhalten.
Das Verhältnis der Tributyrin-Einheiten zu den Methylbutyrat-Einheiten liegt mit der Zahl 20 in der Größenordnung, die nach R. Willstätter (29) für "Esterasen" charakteristisch ist. Der Quotient für "Lipasen" variiert zwischen 625 und 900 (29). "Ausgleichende Aktivierung", sich auswirkend bei "Lipasen" (33,35), bleibt ohne Einfluß.

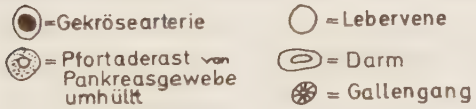
Dieses Ergebnis ist insofern überraschend, als man – einer anatomischen Besonderheit der Karpfenleber zufolge – Enzyme der Leber **u n d** der Pankreasdrüse in den Auszügen erwarten muß und die Bauchspeicheldrüse bei den Säugetieren das Organ der fettspaltenden Lipase ist.

Daß man mit ähnlichen Verhältnissen bei den Fischen rechnen muß, gründet sich darauf, daß in Auszügen aus der – im Gegensatz zu den Weißfischen – allerdings **k o m p a k t e n** Bauchspeicheldrüse von Haifischen "Lipase" nachgewiesen ist (28).

Bei den Weißfischen, Cyprinidae, zu denen der Karpfen gehört, dringen Teile der Bauchspeicheldrüse als "**P a n k r e a s d i f f u s u m**" in die Leber ein (18).

Die Leber des Karpfens besteht nach Ch. Maier (22) aus 4 Lappen, von denen der linke Hauptlappen durch den Darm in 2 Sekundärlappen unterteilt wird. Leberlappen und Darmschlingen stehen in enger topographischer Beziehung zueinander. Zwischen Darm und Leber befindet sich mesenterielles Bindegewebe, in welchem die Pfortadervenen samt Pankreasschläuchen verlaufen.
Die Pfortaderäste dringen, von Pankreaszellen umhüllt, vom Leberrande ins Leberparenchym, wo sie sich kapillär verzweigen. Abbildung 1 ist der Arbeit von Ch. Maier (22) entnommen. Sie zeigt einen Querschnitt durch einen Leberlappen des Karpfens.

Abb. 1



In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen aus der Quotientenbestimmung der Tributyrin- und der Methylbutyrat-Spaltung steht ein Befund von H.J. Vonk (28), wonach Glycerinauszüge aus "isoliertem Karpfenpankreas" gegenüber Olivenöl praktisch unwirksam sind. +)

+) Der Autor präparierte aus 10 Pfund Karpfen etwa 2 g Pankreasgewebe, das in geringer Menge entlang den Darmschlingen verläuft.

Wäre in der Leber des Karpfens "Pankreaslipase" mit enthalten, so würde dies voraussichtlich eine Komplizierung bei der Bestimmung der stereochemischen Spezifität der Leberesterase zur Folge haben. Denn erfahrungsgemäß weisen das Leber- und das Bauchspeichel-Enzym eine Organspezifität auf, d.h. die Enzyme beider Organe unterscheiden sich in ihrer Spezifität gegenüber den Substraten, darunter auch den optisch aktiven, wie sie in racemischen Estern vorliegen (5, 34).

2) Charakterisierung des Enzyms mit Hilfe seiner stereochemischen Spezifität

Daß bei der Karpfenleberesterase konstitutionelle Probleme besonderer Art vorliegen, hat sich uns bei der Charakterisierung dieses Enzyms mit Hilfe seiner stereochemischen Spezifität gezeigt. Andererseits ist es im Wesentlichen auch dieses Charakterisierungsverfahren, das uns die Klärung der besonderen hier obwaltenden Verhältnisse gestattet.

Das Bild der Aktivität der Karpfenleberesterase, das wir unter bestimmten Versuchsbedingungen gegenüber racemischem Mandelsäureäthylester erhalten, wandelt sich beim Altern der Enzymlösungen. Man beobachtet einerseits eine Zunahme des Umsatzes, andererseits eine Veränderung des optischen Auswählens im Sinne einer bevorzugten D(-)-Esterspaltung. In dieser rascheren Spaltung des D(-)-Esters ist in der Hauptsache die Zunahme des Racematumsatzes begründet.

Während bei frisch bereiteten Enzymlösungen (Kochsalz- oder Ammoniakauszüge aus Frischleber oder Acetontrockenpräparaten, Phosphatpuffer) im Bereich der Anfangsspaltung die isolierte Mandelsäure durch ein $[\alpha]_D$ von etwa $+50^\circ$ gekennzeichnet ist, führt die Verwendung von "gealterten" Enzymlösungen zu $[\alpha]_D$-Werten von -70° bis -80° (Tab. I). Diese Veränderung des optischen Auswählens ist in ihrem zeitlichen Ablauf vor allem von der herrschenden Wasserstoffionenkonzentration abhängig. Auch mit der Vornahme einer Dialyse ist eine Änderung des optischen Auswählens verbunden (Tab. I,II).

Ganz anders verhalten sich die bisher beschriebenen Esteraselösungen aus Lebertrockenpräparaten (Mensch, zahlreiche Tierarten): die Enzymlösungen bleiben in ihrer Wirksamkeit viele Monate praktisch konstant. Eine Änderung der stereochemischen Spezifität in größerem Ausmaß ist nie beobachtet worden (6,31). Veränderungen der Spezifität sind tiefergreifenden Vornahmen vorbehalten, wie sie etwa beim proteolytischen Abbau der Enzymkomplexe vorliegen (7).

3) Abhängigkeit des optischen Auswählens von der Menge der angewandten Enzymlösung

Eine weitere bei der Karpfenleberesterase auftretende von der Norm abweichende Erscheinung besteht darin, daß das sterische Auswählen in phosphatgepufferten Ansätzen stark mit der angewandten Menge der Enzymlösung variiert. Die Anwendung schon der doppelten Menge führt zu einer bevorzugten D(-)-Esterspaltung, die sich in einer Verschiebung der $[\alpha]_D$-Werte um etwa 20 Grad ($+65^\circ$ gegenüber $+88^\circ$) auswirkt (Tab. III).

Eine solche Beobachtung ist bei Leberesterasen bisher nie gemacht worden (7). Die E n z y m m e n g e als solche darf auf die Konfigurationsspezifität keinen Einfluß haben.

4) Einfluß von Wasserstoffionenkonzentration und Puffer auf das optische Auswählen

Eine Abhängigkeit der Isomerenspaltung im Racemat von Wasserstoffionenkonzentration und Puffer ist bei der Leberesterase bisher ebenfalls unbekannt (31).

Bei der Karpfenleberesterase+) hängt das optische Auswählen stark von der Wasserstoffionenkonzentration des Versuchsansatzes und dem jeweils angewandten Puffer ab.

In pufferfreien Reaktionsansätzen geht mit einer Verringerung des pH-Wertes, abgesehen von der Erniedrigung des Gesamtumsatzes, eine Minderung der Spaltung des D(-)-Esters einher. Dabei ist der Unterschied der $[\alpha]_D$-Werte für die isolierte Mandelsäure beim Wechsel des pH von 8,0 auf 7,0 noch sehr gering, beim Wechsel auf pH=6,0 dagegen recht erheblich: So betragen im Falle eines NaCl-Auszugs aus Frischleber die $[\alpha]_D$-Werte bei pH=8,0 bzw. =7,0 bzw. =6,0: $-125,9^\circ$ bzw. $-124,5^\circ$ bzw. $-10,9^\circ$ (Tab. IV); die entsprechenden Werte bei einem NaCl-Auszug aus einem Acetontrockenpräparat sind -137° bzw. $-130,2^\circ$ bzw. -53° (Tab. V).

Noch augenfälliger macht sich Phosphatpuffer auf das optische Auswählen im Racemat bemerkbar. Hier ergeben sich folgende Versuchsdaten:

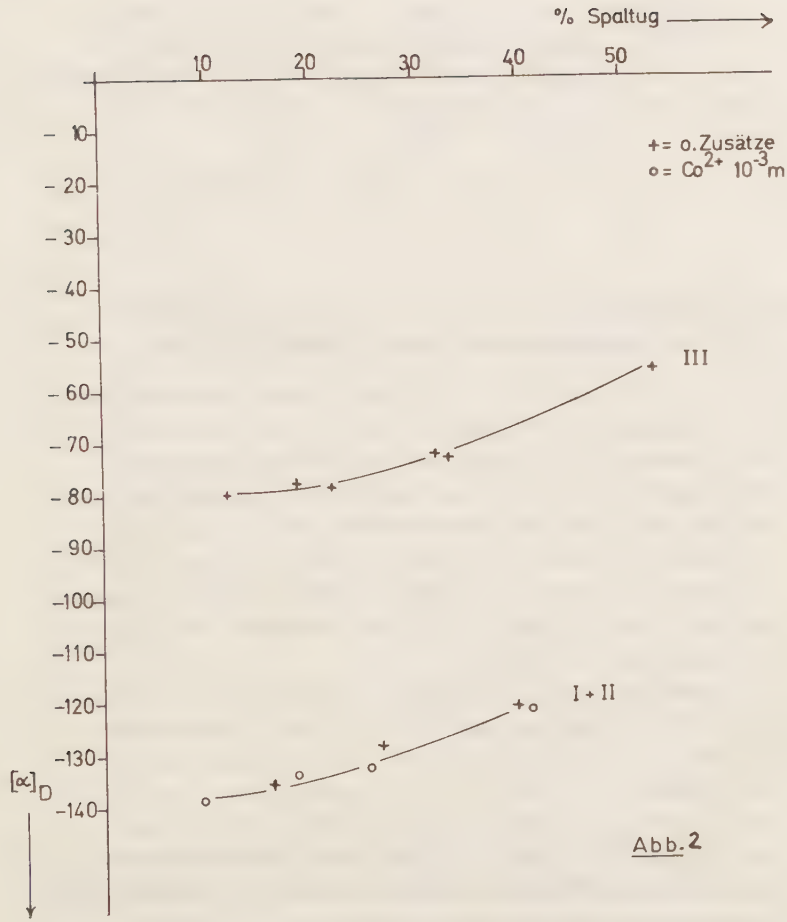
pH=8,0	6 Std.	9 %	$-45,1^\circ$
pH=7,0	12 Std.	6,2%	$+51,8^\circ$
pH=6,0	24 Std.	7,3%	$+107^\circ$ (Tab. IV)

Es beträgt also die Schwankungsbreite in den $[\alpha]_D$-Werten -45° bis $+107^\circ$.

Der Puffer Triäthanolamin-HCl führt bei pH=8,0 in Bezug auf Umsetzungsgeschwindigkeit des Racemats und optisches Auswählen zu sehr ähnlichen Ergebnissen, wie

---

+) Das Wirkungsoptimum der Karpfenleberesterase liegt bei pH=8,0. Auf beiden Seiten des Wirkungsoptimums fällt die Aktivitäts-pH-Kurve verhältnismäßig rasch ab.



Die stereochemische Spezifität der "Metall-abhängigen" Esterase und der "nicht aktivierbaren" Esterase bei pH=8,0

Kurvenbild - I : "Metall-abhängige" Esterase Tab. XIV
- II : "Metall-abhängige" Esterase Tab. XV
- III : "nicht aktivierbare" Esterase Tab. XXII

wir sie im pufferfreien Reaktionsansatz erhalten. Auffallend ist aber, daß schon der Übergang zu pH= 7,0 zu einer Hemmung des Racematumsatzes und zu einer weniger selektiven Spaltung des Racemats führt, verglichen mit den Ergebnissen im pufferfreien Ansatz. Bei einem NaCl-Auszug aus Frischleber resultieren die Werte:

pH=8,0	2 Std.	10,7%	$-132,3^{\circ}$
pH=7,0	12 Std.	4,6%	-96° (Tab. IV)

5) Die Wirkung von Metallsalzen auf die enzymatische Spaltung des racemischen Mandelsäureäthylesters

Eine weitere bisher nur bei der Karpfenleberesterase aufgefundene Erscheinung ist der starke Einfluß, den einige Metallsalze nicht nur auf die Umsetzungsgeschwindigkeit des racemischen Mandelsäureäthylesters sondern auch auf die Selektivität bei der Spaltung der beiden Isomeren im Racemat nehmen. Diese Beobachtung kann man schon bei kaum vorgereinigten Enzympräparaten, beispielsweise bei NaCl-Auszügen aus Acetontrockenpulver , machen.
Die im Falle von Co(II)-, Mg -, Ni(II)- und Mn(II)-Salzen bei verschiedenem pH erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle V zusammengestellt. Man erkennt, daß die Einflußnahme auf das optische Auswählen in erster Linie in schwach saurem Bereich erfolgt. Die Versuche der Tabelle XII (Abb. 3,4), in denen angereicherte Esterasepräparate, die einen weitgehenden Verlust der natürlichen Metallionen erlitten haben, angewendet wurden, zeigen die graduellen Auswirkungen bei den verschiedenen wirksamen Metallionen.

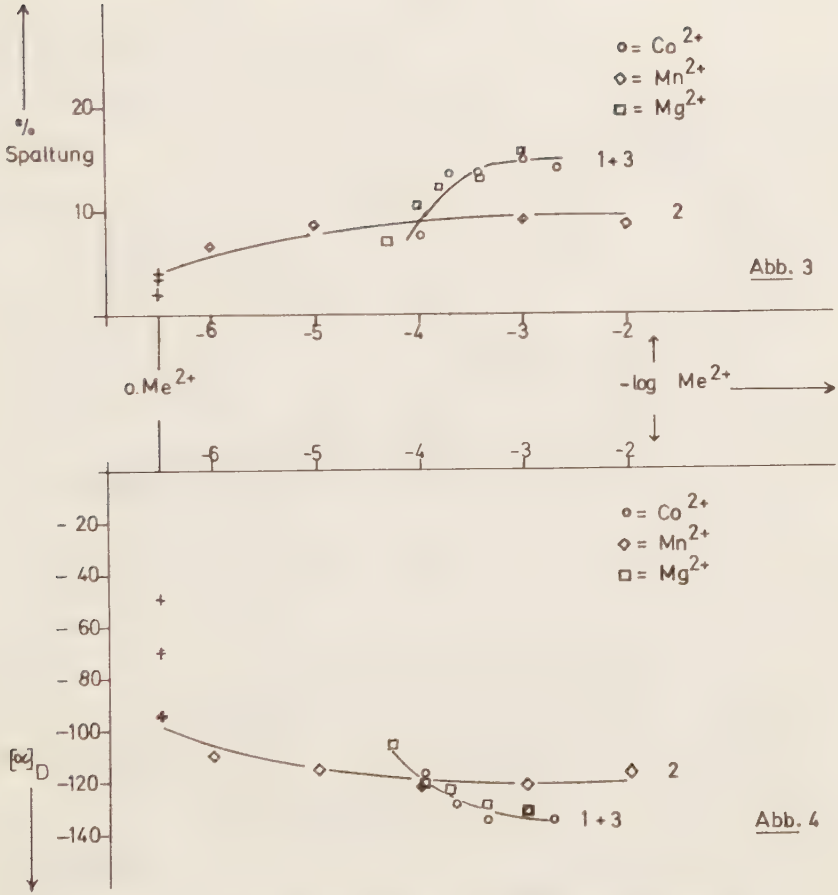


Abb. 3

Abb. 4

Die stereochemische Spezifität der "Metall-abhängigen" Esterase unter dem Einfluß von Metallionen bei pH=8,0

Abb. 3 : Spaltung in Abhängigkeit von der Metallionenkonzentration

Kurvenbild - 1 : Tabelle XII, Präparat 1
- 2 : Tabelle XII, Präparat 2
- 3 : Tabelle XII, Präparat 3

Abb. 4 : $[\alpha]_D$ in Abhängigkeit von der Metallionenkonzentration

Kurvenbild - 1 : Tabelle XII, Präparat 1
- 2 : Tabelle XII, Präparat 2
- 3 : Tabelle XII, Präparat 3

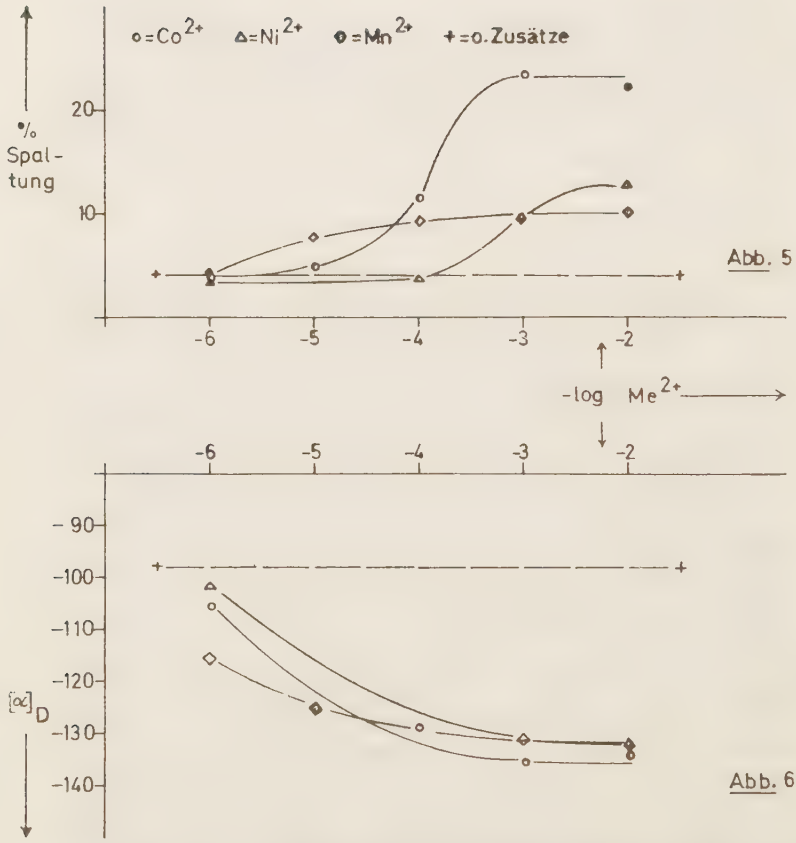


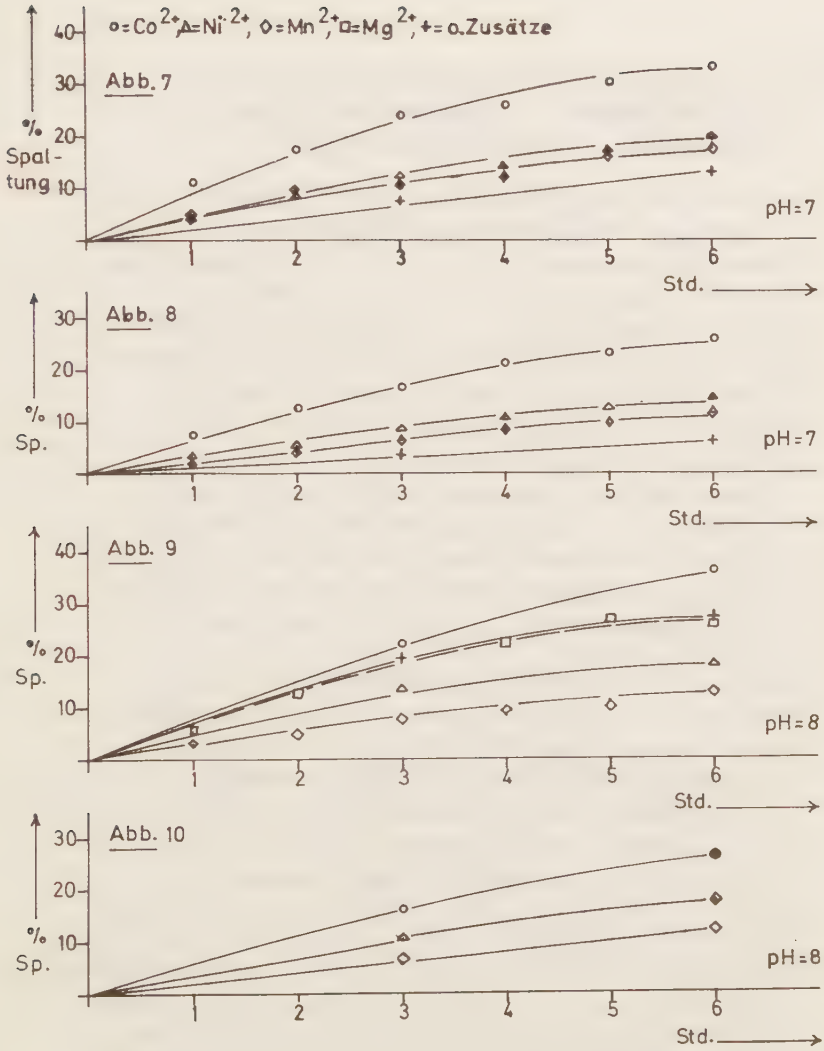
Abb. 5

Abb. 6

Einfluß von Metallionen auf die stereochemische Spezifität der "Metall-abhängigen" Esterase in Anwesenheit von Triäthanolamin-HCl-Puffer pH=7,0

Abb. 5 : Spaltung in Abhängigkeit der Metallionenkonzentration (Tab. VII)

Abb. 6 : $[\alpha]_D$ in Abhängigkeit der Metallionenkonzentration (Tab. VII)



Der zeitliche Verlauf der enzymatischen Mandelsäureäthylesterspaltung in Gegenwart von Metallionen

Abb. 7	: Trockenpräp. - Tab. VI	pH=7,0	Me^{2+} 10^{-2}m
Abb. 8	: Frischauszug - Tab. VII	pH=7,0	Me^{2+} 10^{-2}m
Abb. 9	: Trockenpräp. - Tab. X, XIII	pH=8,0	Me^{2+} 10^{-3}m
Abb.10	: Frischauszug - Tab. IX	pH=8,0	Me^{2+} 10^{-2}m

() Ableitung der stereochemischen Spezifität der "Metall-abhängigen"+) Esterase aus den Spaltungsversuchen mit den isomeren Estern

Bestimmt man bei den isomeren Mandelsäureäthylestern im ungepufferten Versuch die Abhängigkeit der Spaltungsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration, so erhält man bei der graphischen Darstellung der Ergebnisse das in Abb. 11 wiedergegebene Kurvenbild. Daraus läßt sich ohne weiteres die bedeutend raschere Umsetzung des D(-)-Esters gegenüber dem L(+)-Ester ablesen. Dieser Befund gilt sowohl für die Versuche bei pH=8,0 als auch für jene bei pH=7,0. Die zahlenmäßige Festlegung der Dissoziationskonstanten der Esterase(-)-Esterverbindung und der Esterase(+)-Esterverbindung kann aus der in Abb. 12 erfolgten graphischen Darstellung nach dem Verfahren von H. Lineweaver und D. Burk (21) geschehen.

Für den D(-)-Mandelsäureäthylester ergibt sich in den Versuchen sowohl bei pH=8,0 als auch bei pH=7,0 ein K_m-Wert von $9{,}5 \times 10^{-3}$. Die zahlenmäßige Auswertung der Michaelis-Konstante des L(+)-Esters kann in Anbetracht der Lage der Kurven (Abb. 11,12) nur zu einem angenäherten Wert führen.Sie beträgt schätzungsweise $5{,}4 \times 10^{-3}$. Die Affinität der Esterase zum (+)-Ester ist also etwa 1,8mal größer als zum (-)-Ester.

+) Das Enzym, dessen Wirkung gegenüber gewissen Substraten durch Zusatz oder in natürlicher Anwesenheit von Metallsalzen gesteigert ist, bezeichnen wir als "M e t a l l - a b h ä n g i g e" Esterase im Gegensatz zu der später zu beschreibenden "n i c h t a k t i v i e r b a r e n" Esterase (vgl. BI 10).

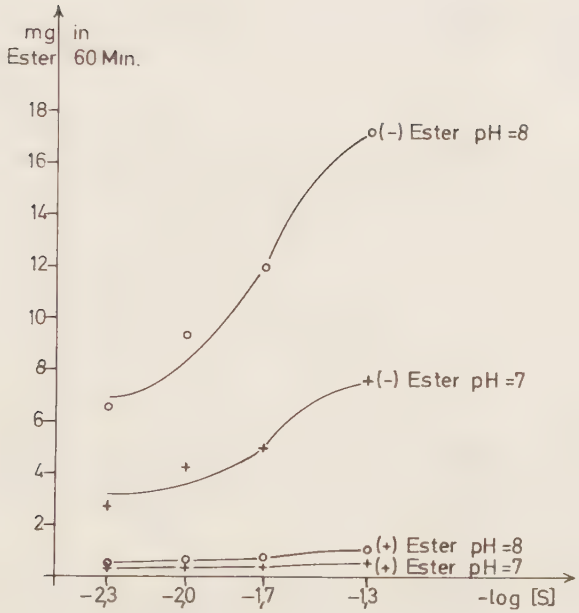


Abb. 11 (vgl. Tab. XVI)

Aktivitäts-p_S-Kurven der isomeren Mandelsäureäthylester
(NaCl-Auszug aus einem Acetontrockenpräparat der Karpfenleber)

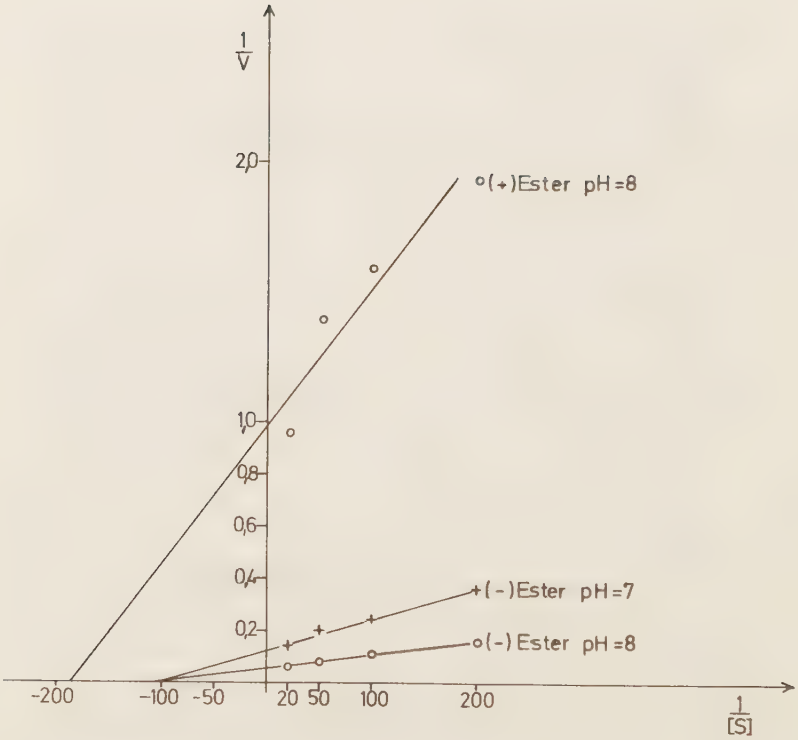


Abb. 12 (vgl. Tab. XVI)

Graphische Darstellung nach H. Lineweaver und D. Burk (21) zur Ermittlung von K_m und V_{Max} (vgl. Abb. 11)

Umgekehrt zerfällt aber die Esterase(-)-Esterverbindung 20mal rascher als die Esterase(+)-Esterverbindung. Das Verhältnis

$$k(-) : k(+) = 20 : 1$$

ergibt sich unmittelbar aus den für sehr hohe Substratkonzentrationen extrapolierten Geschwindigkeiten.

Bei relativ hoher Substratkonzentration wird sich das Enzym entsprechend dem Verhältnis seiner Affinitäten $1/K_m$ auf (+)- und (-)-Ester verteilen, so daß das Verhältnis der Reaktionsgeschwindigkeiten bei Anwendung des Gemisches:

$$v(-)/v(+) = k(-)/k(+) \cdot K_m(+)/K_m(-) = 20/1 \cdot 1/1{,}8 = 11$$

zugunsten des (-)-Esters liegen wird.

Demgegenüber berechnen wir im Bereich der Anfangsspaltung aus dem $[\alpha]_D$-Wert = -135° und der abgespaltenen Mandelsäure im R a c e m a t -versuch (Substratkonzentration 0,028 Mol/l, pH=8,0) ein Verhältnis von

$$1 : 13$$

für die Umsetzung der Enzym(+)-Ester- und Enzym(-)-Ester-Verbindungen.

Angesichts der geringfügigen Spaltung des L(+)-Mandelsäureäthylesters (Abb. 11) bzw. der dabei nicht auszuscheidenden Fehlerquellen ist die Übereinstimmung der auf verschiedenen Wegen erhaltenen Ergebnisse (1 : 11 bzw. 1 : 13) als sehr befriedigend zu bewerten.

Aus den Versuchen in Anwesenheit von Metallsalzen bzw. von AEDTA[+)] bei der Spaltung der isomeren Ester (Tab. XVII) erhält man Ergebnisse, die die Befunde bei den entsprechenden Versuchen am Racemat erklären:

a) Zusatz von $MgCl_2$ zum Versuchsansatz (10^{-3} Mol/l) bei pH=8,0 führt zu einer Erhöhung der D(-)-Esterspaltung, die L(+)-Esterspaltung wird nicht merklich verändert.

b) Zusatz von $MnSO_4$ zum Versuchsansatz (10^{-3} Mol/l) bei pH=8,0 erniedrigt die Zerfallsrate der Enzym(-)-Esterverbindung um fast die Hälfte, die L(+)-Esterspaltung bleibt unverändert.

c) In Gegenwart von AEDTA wird die D(-)-Esterspaltung um 92,5% gehemmt, die L(+)-Esterspaltung nur um 29% erniedrigt (Substratkonzentration 0,05 Mol/l, pH=8,0).

7) Variierung der Substratkonzentration, Einfluß von Zusätzen

a) Substratkonzentration

Bei der Karpfenleberesterase sehen wir mit steigender Substratkonzentration den Substratumsatz erhöht. Das optische Auswählen ändert sich dabei aber nicht (Tab. XIV). Damit gehört dieses Enzym nach der von E. Bamann und R. Ammon (4) durchgeführten Unterscheidung zum Typ I, der jene Esterasen umfaßt, deren optisches Auswählen unabhängig von der Konzentration des racemischen Substrates ist.

+) AEDTA = Äthylendiamintetraacetat

b) Hydrolyseprodukte: Äthanol und Mandelsäure

Beispiele für das Einwirken der Hydrolyseprodukte auf die Selektivität sind die Leberesterasen des Menschen und des Mantelpavians, deren optisches Auswählen im ersteren Falle durch das Spaltungsprodukt Äthanol, im zweiten durch das Spaltungsprodukt Säure verändert wird (8,9,26).

Die "Metall-abhängige" Esterase der Karpfenleber wird in ihrer Selektivität gegenüber den beiden Isomeren bei der Racematspaltung durch Zusatz weder von Äthanol noch von Mandelsäure beeinflußt.

Während der Alkohol auch für die Gesamtspaltung belanglos ist, wird diese durch Mandelsäure stark gehemmt. Daher ist keine Proportionalität zwischen Zeit und Umsatz, wie sie bei vielen Aliesterasen beobachtet wird, gegeben (Tab. XIV).

c) Optisch aktive Fremdstoffe

Unter den zur Charakterisierung der Esterasen verwendeten Fremdstoffen spielt Strychnin eine wichtige Rolle (6,11).

Die Reaktionskinetik der Karpfenleberesterase wird durch Strychnin kaum beeinflußt: Wir beobachteten sowohl bei pH=8,0 als auch bei pH=7,0 eine geringe Hemmung der D(-)-Esterspaltung (Tab. XIV).

d) Diäthyl-p-nitrophenylphosphat ("E 600")

Esterasen, die zum Serin-Histidin-Typ gehören, ist eine Reaktion mit organischen Phosphorsäureestern eigentümlich (24,25). Dabei wird das Enzym am Serin des aktiven Zentrums phosphoryliert, wodurch Wirksamkeitshemmung eintritt.

Auf Grund der Hemmwirkung von E 600 unterteilt W.N. Aldridge die Esterasen in einen A- und einen B-Typ (1). Der erste wird durch E 600 ($< 10^{-3}$ Mol/l) nicht, der zweite schon durch 10^{-7} bis 10^{-8} Mol/l gehemmt.

Die "Metall-abhängige" Karpfenleberesterase+) wird durch E 600 ($1{,}4 \times 10^{-4}$ Mol/l) in ihrer Wirksamkeit nicht beeinflußt.

e) Metallkomplexbildner und Phosphat

Der Effekt der in unseren Versuchen eingesetzten Anionen Phosphat, Oxalat, Citrat und des AEDTA auf die Aktivität der "Metall-abhängigen" Esterase ist von unterschiedlicher Größe und nimmt in der genannten Reihenfolge der Agentien zu (Tab. XIX). Das von der Konzentration des Komplexbildners abhängige Ausmaß der Hemmung der D(-)-Esterspaltung kann an der Änderung des $[\alpha]_D$-Wertes abgelesen werden.

Eine zusätzliche Hemmung der D(-)-Esterspaltung unter dem Einfluß von AEDTA zeigt sich auch in phosphatgepufferten Versuchsansätzen (Tab. III, IV A).

f) Schwermetallsalze und PCMB++)

Unsere Befunde ergeben eine starke Hemmung der D(-)-Esterspaltung in der Reihenfolge $Hg^{2+} > Pb^{2+} > Zn^{2+} > PCMB > Cu^{2+} > Cd^{2+}$ (Tab. XVIII).

+) Eine Hemmung beobachteten wir dagegen bei der "nicht aktivierbaren" Karpfenleberesterase, ebenso bei der Leberesterase des Silberfelchens und der Regenbogenforelle. Das gleiche trifft nach K. Krisch (20) für die hoch gereinigte Schweineleber-mikrosomenesterase zu.

++) PCMB = p-Chlormercuribenzoesäure-Natriumsalz

8) Anreicherung des Enzyms und Auftrennung

a) Anreicherung

Ausgehend von einem Kochsalzauszug aus Frischleber konnten wir die "Metall-abhängige" Karpfenlebercsterase durch fraktionierte Ammoniumsulfat- und Essigsäure-Fällung auf das Zehnfache konzentrieren. In der folgenden Übersicht ist der Aufarbeitungsvorgang wiedergegeben:

Fraktion	Volumen in ml	Ges. Prot. mg	Aktivität +)	Ges. Aktiv.	Anreicherung	Ausbeute in %
	440	9240	0,46	4240	1	100
A	50% AS++) 250	2500	0,256	640	-	15
B	80% AS 74	1900	1,38	2620	3,1	62
C	Essigs. Fäll. 65	487	4,6	2210	10	52

+) Aktivität = in 120 Min. gebildete Mandelsäure(mg) pro mg Eiweiß (Vol. des Reakt.Ans. = 50 ml; Substratkonz. = 0,028 Mol/l).

Da mit der Anreicherung des Enzyms eine Verarmung an natürlichen Metallionen vor sich geht (Tab. XII), erfolgt die Aktivitätsmessung unter Zusatz von Co^{2+} (10^{-3} Mol/l).

++) AS = Ammoniumsulfatsättigung

Fraktion A: Der bei der Ammoniumsulfatfällung gewonnene Niederschlag ist enzymarm und reich an unwirksamem Eiweiß.

Fraktion B: Der Niederschlag bei 80% Ammoniumsulfatsättigung enthält das Enzym in etwa 3facher Anreicherung.

Fraktion C: Nach Entfernung von unwirksamem Eiweiß aus Lösungen des Niederschlages B durch Essigsäurefällung steigt die Enzymanreicherung auf den zehnfachen Betrag, verglichen mit der Aktivität des Kochsalzauszugs aus Frischleber.

Dauerpräparate:

Mit Hilfe von reichlich Aceton kann man aus den Lösungen der Fraktionen B und C Acetontrockenpräparate erhalten, die sehr beständig sind und leicht mit n/40 Ammoniakflüssigkeit in Lösung gebracht werden können. Die Acetontrockenpräparate sind bei Aufbewahrung im Kühlschrank über Monate haltbar.
Die Gefriertrocknung liefert zwar ebenfalls Trockenpulver, die klar löslich sind, aber sie haben den Nachteil, stark hygroskopisch zu sein.

b) Auftrennung angereicherter Enzympräparate

Trennungen führten wir an Sephadex (Pharmacia Uppsala, Schweden) und an DEAE-Cellulose (Anionenaustauscher von Serva) aus. An Sephadex werden die Stoffe nach der Molekülgröße sortiert (Siebeffekt). Die großen Moleküle treten zuerst aus der Säule aus.
Das bei Anwendung des Dextrangels Sephadex 200 erhaltene Ergebnis ist in Abb. 13 dargestellt (nähere Angaben s.

Methodik). Im Elutionsspektrum zeigt der schraffierte Teil die Anwesenheit der "Metall-abhängigen" Esterase an. Diese Fraktion unterscheidet sich in ihrer Selektivität von derjenigen des eingesetzten angereicherten Enzympräparates nicht.

Konzentrat: $[\alpha]_D = -137^\circ$ bei 24,5% Spaltung
Fraktion 30-36: $[\alpha]_D = -132{,}5^\circ$ bei 21,9% Spaltung
(Versuchsansätze: pH=8,0; Co^{2+} 10^{-3} Mol/l)

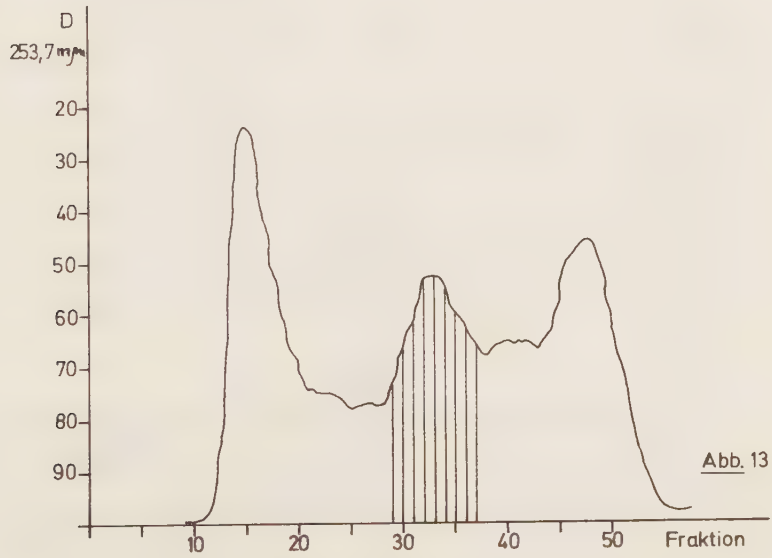


Abb. 13

Zum gleichen Ergebnis führten Versuche am Ionenaustauscher DEAE-Cellulose. Abb. 14 zeigt das Elutionsbild, wobei der schraffierte Teil wiederum die Anwesenheit der "Metall-abhängigen" Esterase anzeigt. Die in den

Enzymfraktionen 30 bis 32 sowie 35 bis 38 auftretende Esterase-Selektivität unterscheidet sich von der im angewandten Konzentrat vorhandenen nicht.

Konzentrat: $[\alpha]_D = -137^\circ$ bei 24,5% Spaltung
Fraktion 30-32: $[\alpha]_D = -130{,}8^\circ$ bei 25,1% Spaltung
Fraktion 35-38: $[\alpha]_D = -128^\circ$ bei 10,1% Spaltung
(Versuchsansätze: pH=8,0; Co^{2+} 10^{-3} Mol/l)

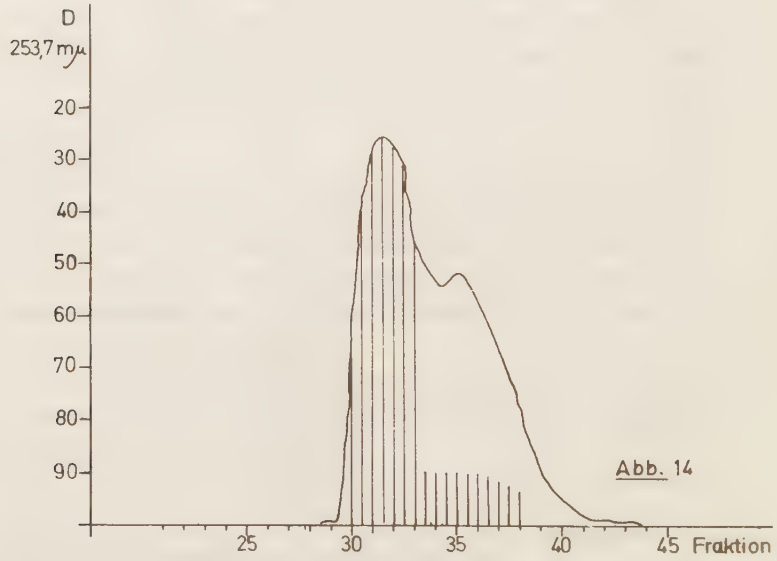


Abb. 14

9) Die Stabilität der "Metall-abhängigen" Esterase

Neutrale bis schwach alkalische Enzymlösungen halten sich – bei +5°C im Kühlschrank aufbewahrt – nur kurze Zeit ohne nennenswerte Änderung der Wirksamkeit: Schon nach einer Woche wird eine starke Wirkungs- und Selektivitätsminderung festgestellt. Dabei ist die Spaltung des D(-)-Esters stark erniedrigt, was veränderte $[\alpha]_D$-Werte im Racematversuch zur Folge hat:

Anfangswerte:	20,2% Spaltung	$[\alpha]_D = -142^\circ$
nach 8 Tagen:	10,7% Spaltung	$[\alpha]_D = -109^\circ$
nach 17 Tagen: (Endwerte)	4,9% Spaltung	$[\alpha]_D = -69,9^\circ$

Nach der beschriebenen Veränderung (Alterung) bleibt die Restaktivität der Enzymlösungen über lange Zeitabschnitte unverändert, auch die Selektivität erhält sich dabei konstant ($[\alpha]_D$-Werte um -70°). Die Ergebnisse von Spaltungsversuchen bei pH=7,0 und pH=8,0 unter optimaler Kobaltsalzkonzentration sind in den Tabellen XX und XXI zusammengestellt.

10) Auftreten einer zweiten "nicht aktivierbaren" Esterase

Die in "g e a l t e r t e n" Enzymlösungen vorliegende Esterase können wir auch unmittelbar aus Acetontrockenpräparaten oder aus Frischleber durch Extraktion mit n/40 Essigsäure und anschließender Dialyse erhalten.
Dieses Enzym unterscheidet sich grundlegend von der "Metall-abhängigen" Esterase:
Tributyrin und Buttersäuremethylester werden – auch unter "ausgleichender Aktivierung" – nicht gespalten.

Die stereochemische Spezifität ist weniger ausgeprägt. Im Bereich der Anfangsspaltung wird ein $[\alpha]_D$-Wert um -70° gemessen. Ein Einfluß der angewandten Menge Enzymlösung auf das optische Auswählen wird nicht festgestellt.

Es besteht keine Abhängigkeit der stereochemischen Spezifität von der Wasserstoffionenkonzentration in pufferfreien und gepufferten Ansätzen (Phosphatpuffer, Triäthanolamin-HCl-Puffer). Die Gesamtspaltung ist durch Phosphatpuffer pH=6,0 und pH=7,0 im Vergleich zu den pufferfreien Versuchen stark, durch Triäthanolamin-HCl-Puffer pH=7,0 wenig gehemmt (Tab. IV B).

Metallsalze, die die "Metall-abhängige" Esterase in ihrer Aktivität und Selektivität beeinflußen (vgl. BI 5), sind ohne Einfluß[+].

Unter den Hydrolyseprodukten ist auch Mandelsäure für Umsatz und Selektivität belanglos, ebenso ein Zusatz von Strychnin (Tab. XXII).

E 600 in 7×10^{-5}m Lösung hemmt das Enzym zu 53%. Der $[\alpha]_D$-Wert im Hemmversuch beträgt $-41{,}2^\circ$ gegenüber $-76{,}7^\circ$ im nicht gehemmten Vergleichsansatz. Nach der Einteilung von W.N. Aldridge (1) gehört die Esterase zum B-Typ.

Metallkomplexbildner sind wirkungslos in Bezug auf Aktivität und Selektivität des Enzyms.

+) Wir bezeichnen deshalb die in "gealterten" Enzymlösungen oder in essigsauren Auszügen enthaltene Esterase als "n i c h t a k t i v i e r b a r e" Esterase.

Schwermetallsalze und PCMB in 10^{-4}m Lösung bleiben auf das Enzym in Spaltungsversuchen bei pH=7,0 ohne Einfluß, bei pH=8,0 wird durch Zn^{2+}, Cu^{2+} und Pb^{2+} eine geringe Hemmung (bis zu 20%) ausgeübt. Das optische Auswählen ist unverändert.

Das Einzige, was die "nicht aktivierbare" Esterase mit der "Metall-abhängigen" gemeinsam hat: Das optische Auswählen ist unabhängig von der Substratkonzentration. Damit gehört auch diese Esterase nach der von E. Bamann und R. Ammon durchgeführten Unterscheidung zum Typ I.

11) Ableitung der stereochemischen Spezifität der "nicht aktivierbaren" Esterase aus den Spaltungsversuchen mit den isomeren Estern.

Der graphischen Darstellung der Abb. 15 entnehmen wir sowohl für den L(+)- als auch für den D(-)-Ester eine K_m von $1x10^{-2}$.

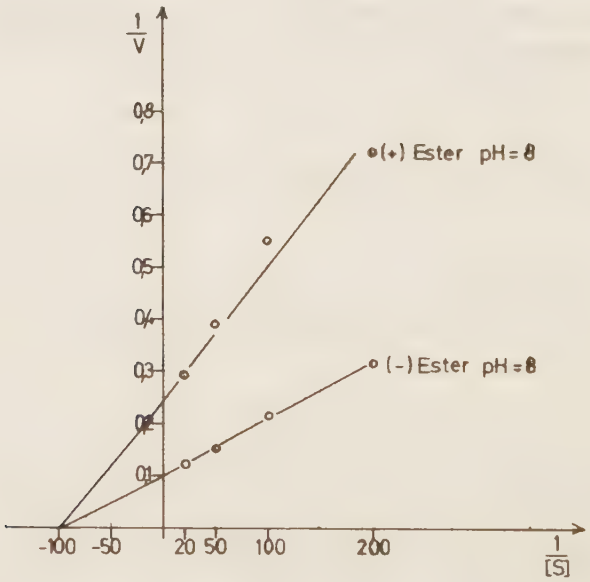


Abb. 15 (vgl. Tab. XXIII)

Graphische Darstellung nach H. Lineweaver und D. Burk (21) zur Ermittlung von K_m und V_{Max}

Das Verhältnis der maximalen Zerfallsgeschwindigkeiten der Enzym-(+)-Esterverbindung und der Enzym-(-)-Esterverbindung beträgt 1:2,5.

Ein Zusatz von AEDTA oder von $MgCl_2$ zu den Versuchsansätzen mit den getrennten Isomeren bleibt ohne Einfluß (Substratkonzentration: 0,02 Mol/l), (Tab. XXIII).

Weitgehend verschieden von den Verhältnissen bei dem "Metall-abhängigen" Enzym sind demnach jene bei der zweiten, "nicht aktivierbaren" Esterase: Hier sind die Unterschiede in den maßgebenden Konstanten sehr viel geringer, so daß auch die Erscheinung der optischen Spezifität weniger ausgeprägt ist. Während sich die Zerfallskonstanten für den Enzym-(+)-Ester und den Enzym-(-)-Ester in dem Verhältnis 1:2,5 halten, besteht zwischen der Affinität des Enzyms zu den beiden optischen Antipoden des Esters überhaupt kein Unterschied.

Mit Hilfe der errechneten Konstanten läßt sich der in Anfangszeiten der Spaltung gefundene Wert für die spezifische Drehung der Mandelsäure ($[\alpha]_D$ = etwa -70°) errechnen. Auch die Ergebnisse in Anwesenheit von AEDTA bzw. von Metallsalzen in Spaltungsversuchen mit den isomeren Estern bestätigen das im R a c e m a t - versuch erhaltene Bild.

Tabelle I

Die enzymatische Spaltung des rac. Mandelsäure-äthylesters in Abhängigkeit von Alter, pH und Dialyse der Enzymlösung

Die Versuchsansätze von 50 ml enthalten: 20 ml Enzymlösung (aus Acetontrockenpräparat), 0,25 g rac. Mandelsäureäthylester, 2 g Phosphatpuffer pH=7,0. Reaktionsdauer = 24 Std.; t = 25,0°C.

Art der Enzymlösung	Alter der Enzymlösung in Tagen	abgespaltene Mandelsäure		
		mg	%	$[\alpha]_D$
nicht dialys. ammoniak. Auszg.	0	27	12,8	+ 50,6
	27	20	9,3	+ 13
	57	35,4	16,8	- 64,9
dialysierter ammoniak. Auszg.	1	33	15,7	+ 14,2
	27	42,2	19,9	- 75,8
nicht dialys. essigs. Auszg.	0	40	18,8	- 32,2
	1	45	19,7	- 83
dialysierter essigs. Auszg.	1	54	25,6	- 71,8
	8	50,6	24	- 77,3

Tabelle II

Die enzymatische Spaltung des rac. Mandelsäure-äthylesters in Abhängigkeit von Alter und pH der Enzymlösung

Die Versuchsansätze von 50 ml enthalten: 20 ml Enzymlösung (Ammoniakalischer Auszug aus Acetontrockenpräparat wurde in zwei gleiche Volumina geteilt. Teil I stellten wir mit n/20 Essigsäure auf den pH=4,5 ein und zentrifugierten den entstandenen Proteinniederschlag ab. Teil II brachten wir mit n/40 Ammoniakflüssigkeit auf das Volumen von Teil I nach der pH-Einstellung.), 0,25 g rac. Mandelsäureäthylester, 2 g Phosphatpuffer pH=7,0. Reaktionsdauer = 24 Std.; t=25,0°C.

pH der Enzymlösung	Alter der Enzymlösung in Tagen	abgespaltene Mandelsäure		
		mg	%	$[\alpha]_D$
9	0	15	7,1	+ 36,8
9	3	10,5	5	+ 40,5
9	6	9,9	4,7	+ 34,4
9	16	11,4	5,4	+ 4,4
4,5	0	7,2	3,4	+ 29,6
4,5	3	17,8	8,4	- 14,3
4,5	6	22	10,5	- 34,8
4,5	16	30,3	14,3	- 70,4

Tabelle III

Der Einfluß von AEDTA und Menge an Enzymlösung auf die enzymatische Spaltung des racemischen Mandelsäureäthylesters

Die Versuchsansätze von 50 ml enthalten: Enzymlösung (A = physiol. NaCl-Auszug aus Karpfenfrischlebern; B = essigsaurer Auszug, dialysiert), 0,25 g rac. Mandelsäureäthylester, 2 g Phosphatpuffer pH=7,0; t = 25,0°C.

Reakt.-Dauer in Std.	Enzymlsg. A ml	+) AEDTA Mol/l	abgespaltene Mandelsäure		
			mg	%	$[\alpha]_D$
24	10	-	46,5	22	+ 65
48	5	-	39,9	18,9	+ 88,6
10	10	10^{-2}	15,2	7,2	+120
24	5	"	18,4	8,7	+126
24	10	"	34	16	+125
	Enzymlsg. B ml				
24	20	-	47,4	22,4	- 72,8
24	20	10^{-2}	45,7	21,7	- 73,5

+) Äthylendiamintetraacetat

Tabelle IV

Die stereochemische Spezifität eines NaCl-Auszugs aus Frischleber und eines essigsauren, dialysierten Auszugs aus Acetontrockenpräparat in Abhängigkeit von Wasserstoffionenkonzentration, Puffer und Zusätzen

Die Versuchsansätze von 50 ml enthalten: 5 ml Enzymlösung A (physiol. NaCl-Auszug aus Frischlebern) bzw. 20 ml Enzymlösung B (essigsaurer Auszug, dialysiert aus Acetontrockenpräparat), 0,25 g rac. Mandelsäureäthylester. Puffer und Zusätze sind jeweils angegeben; t = 25,0°C.
In der Tabelle sind neben der Reaktionsdauer die prozentuale Spaltung des Mandelsäureäthylesters und der $[\alpha]_D$-Wert des Spaltungsproduktes Mandelsäure angegeben.

1. Die Versuchsansätze von 50 ml enthalten 2,0 g Phosphatpuffer

Enzym-lsg.	pH=6,0	pH=7,0	pH=8,0
A	24 Std. 7,3% +107°	12 Std. 6,2% + 51,8°	6 Std. 9% - 45,1°
B	24 Std. 18,6% - 72°	5 Std. 11,8% - 76,7°	2 Std. 12,4% - 72,5°
	Zusatz von: AEDTA 10^{-2} Mol/l	Zusatz von: AEDTA 10^{-2} Mol/l	Zusatz von: AEDTA 10^{-2} Mol/l
A	24 Std. 8,4% +101,2°	24 Std. 10% +100,5°	12 Std. 7,6% + 60,7°
B	24 Std. 18% - 72°	5 Std. 13% - 76°	2 Std. 12,7% - 82,5°

2. Die Versuchsansätze von 50 ml enthalten 20 ml Triäthanolamin-HCl-Puffer (0,5m)

Enzym-lsg.		pH=7,0	pH=8,0
A		12 Std. 4,6% - 96°	2 Std. 10,7% -132,3°
B		3 Std. 13% - 82,3°	2 Std. 12% - 80,9°
		Zusatz von: AEDTA 10^{-2} Mol/l	Zusatz von: AEDTA 10^{-2} Mol/l
A		24 Std. 4,7%	24 Std. 4,6%
B		3 Std. 12,1% - 76,6°	2 Std. 9,8% - 82,4°

3. Spaltungsversuch im pufferfreien Reaktionsansatz durch "pH-Stat-Titration" bei 25,0°C am Radiometer

Enzym-lsg.	pH=6,0	pH=7,0	pH=8,0
A	12 Std. 7,4% - 10,9°	2 Std. 6,7% -124,5°	2 Std. 15,4% -125,1°
B	2 Std. 12,3% - 70,7°	2 Std. 13,6% - 78,6°	2 Std. 15,2% - 71,8°
		Zusatz von: AEDTA 10^{-2} Mol/l	Zusatz von: AEDTA 10^{-2} Mol/l
A		3 Std. keine Spaltung	2 Std. keine Spaltung
B			2 Std. 14,3% - 76,3%

Tabelle V

Der Einfluß von Metallionen auf die enzymatische Spaltung des rac. Mandelsäureäthylesters im pufferfreien Reaktionsansatz

Die Versuchsansätze von 50 ml enthalten: 20 ml Enzymlösung (physiol. NaCl-Auszug aus Acetontrockenpräparat), 0,25 g rac. Mandelsäureäthylester und Metallsalze in angegebener Molarität.
Die Spaltung wurde durch "pH-Stat-Titration" verfolgt; t = 25,0°C.
In der Tabelle sind neben der Reaktionsdauer die prozentuale Spaltung des Substrates und der $[\alpha]_D$-Wert des Spaltungsproduktes Mandelsäure angegeben.

pH=6,0	pH=7,0	pH=8,0
930 Min. 11,4% - 53°	120 Min. 9% -130,2° 250 Min. 19% -129,8°	50 Min. 12,2% -137° 130 Min. 21,6% -143,8°
Zusatz von Co^{2+} 10^{-2} Mol/l	Zusatz von Co^{2+} 10^{-2} Mol/l	Zusatz von Co^{2+} 10^{-2} Mol/l
105 Min. 10,1% -115,8° 240 Min. 18,6% -123,8°	25 Min. 7,4% -136,2° 65 Min. 17,3% -134° 180 Min. 28% -134°	90 Min. 25,0% -143° 180 Min. 29,9% -145°
Zusatz von Mg^{2+} 10^{-2} Mol/l	Zusatz von Mg^{2+} 10^{-2} Mol/l	Zusatz von Mg^{2+} 10^{-2} Mol/l
210 Min. 15,3% - 92,5°	50 Min. 10,6% -131,5° 130 Min. 20,5% -127,5°	50 Min. 15,5% -133,1° 170 Min. 28,7% -137,5°
Zusatz von Ni^{2+} 10^{-2} Mol/l	Zusatz von Ni^{2+} 10^{-2} Mol/l	Zusatz von Ni^{2+} 10^{-2} Mol/l
105 Min. 7,4% -109,8° 180 Min. 10,8% -110,5°	60 Min. 11,1% -134° 150 Min. 19,5% -128,3°	60 Min. 9,9% -130,6°
Zusatz von Mn^{2+} 10^{-2} Mol/l	Zusatz von Mn^{2+} 10^{-2} Mol/l	Zusatz von Mn^{2+} 10^{-2} Mol/l
120 Min. 6,2% -107,2°	75 Min. 6,9% -117° 140 Min. 10,8% -125,6°	75 Min. 6,6% -130,8° 180 Min. 12,7% -133,5°

Tabelle VI

Einfluß von Metallionen auf die stereochemische Spezifität der "Metall-abhängigen" Esterase in Anwesenheit von Triäthanolamin-HCl-Puffer pH=7,0

Die Versuchsansätze von 50 ml enthalten: 20 ml Enzymlösung (physiol. NaCl-Auszug aus Acetontrockenpräparat), 0,25 g rac. Mandelsäureäthylester, 20 ml Triäthanolamin-HCl-Puffer (0,5m) pH=7,0 und Metallsalze in den angegebenen molaren Konzentrationen; t = 25,0°C.

Reakt.-Dauer in Std.	Zusatz von Me^{2+} (Mol/l)	abgespaltene Mandelsäure		
		mg	%	$[\alpha]_D$
3	-	15,8	7,6	-119
1	$Co^{2+}10^{-2}$	23,8	11,2	-135,1
2	"	37,3	17,7	-133,5
3	"	50,3	23,9	-135,2
4	"	54,6	25,9	-135,5
5	"	64	30,3	-134,3
6	"	69,8	33	-135
24	"	95	44,9	-126,2
1	$Co^{2+}10^{-3}$	27	12,8	-135
2	"	41,5	19,7	-137,3
4	"	57,8	27,4	-132,3
5	"	63,5	30,1	-133,3
6	"	67,3	31,9	-134,9
3	$Co^{2+}10^{-4}$	26,8	12,7	-127
6	"	37,6	17,8	-134,6

Forts. Tabelle VI

Reakt.-Dauer in Std.	Zusatz von Me^{2+} (Mol/l)	abgespaltene Mandelsäure		
		mg	%	$[\alpha]_D$
1	$Ni^{2+}10^{-2}$	11	5,2	-136
2	"	17,8	8,4	-133,8
3	"	26,5	12,6	-128,5
4	"	30	14,2	-130,5
5	"	35,9	17	-126,7
6	"	41,8	19,8	-130
3	$Ni^{2+}10^{-3}$	18,6	8,8	-126
6	"	28,8	13,6	-127,2
3	$Ni^{2+}10^{-4}$	12,8	6,1	-116,4
6	"	20,2	9,6	-119,9
1	$Mn^{2+}10^{-2}$	8,5	4	-130
2	"	17,8	8,4	-129
3	"	22,5	10,7	-124,8
4	"	25,4	12	-127,3
5	"	33,8	16	-124,6
6	"	37	17,5	-124
3	$Mn^{2+}10^{-3}$	25	11,8	-126
6	"	39,7	18,8	-129,7
3	$Mn^{2+}10^{-4}$	24,7	11,7	-127,8
6	"	37,3	17,7	-131

Tabelle VII

Einfluß von Metallionen auf die stereochemische Spezifität der "Metall-abhängigen" Esterase in Anwesenheit von Triäthanolamin-HCl-Puffer pH=7,0

Die Versuchsansätze von 50 ml enthalten: 3 ml Enzymlösung (wäss. Auszug aus Karpfenfrischlebern), 0,25 g rac. Mandelsäureäthylester, 20 ml Triäthanolamin-HCl-Puffer pH=7,0 und Metallsalze in den angegebenen molaren Konzentrationen. Reaktionsdauer = 6 Std.; t = 25,0°C.

Zusatz von Me^{2+} (Mol/l)	abgespaltene Mandelsäure		
	mg	%	$[\alpha]_D$
-	8,7	4,1	- 98
$Co^{2+}10^{-2}$	46,4	22	-132,9
" 10^{-3}	49,7	23,6	-136
" 10^{-4}	24,5	11,6	-128,4
" 10^{-5}	10,2	4,8	-125
" 10^{-6}	8	3,8	-105,5
$Ni^{2+}10^{-2}$	26,4	12,5	-132
" 10^{-3}	20,2	9,6	-126
" 10^{-4}	7,5	3,5	-131,3
" 10^{-6}	7,5	3,5	-102,8
$Mn^{2+}10^{-2}$	22,4	10,2	-132
" 10^{-3}	19,6	9,3	-132
" 10^{-4}	20	9,5	-136,5
" 10^{-5}	16,6	7,9	-125,5
" 10^{-6}	9,6	4,5	-115,4

Tabelle VIII

Einfluß von Metallionen auf die stereochemische Spezifität der "Metall-abhängigen" Esterase in Anwesenheit von Triäthanolamin-HCl-Puffer pH=7,0

Die Versuchsansätze von 50 ml enthalten: 4 ml Enzymlösung (wäss. Auszug aus Karpfenfrischlebern), 0,25 g rac. Mandelsäureäthylester, 20 ml Triäthanolamin-HCl-Puffer (0,5m) pH=7,0 und Metallsalze in 10^{-2} molarer Konzentration; t = 25,0°C.

Reakt.-Dauer in Std.	Zusatz von	abgespaltene Mandelsäure		
		mg	%	$[\alpha]_D$
3	-	7,3	3,5	-116,5
6	-	12,3	5,8	-117,4
1	Co^{2+}	16,1	7,6	-132
2	"	26,7	12,6	-135,5
3	"	34,7	16,4	-130
4	"	44,9	21,3	-128,9
5	"	48,4	22,9	-133
6	"	54,6	25,9	-132,5
1	Ni^{2+}	7,6	3,6	-116,2
2	"	11,1	5,3	-133,7
3	"	17,7	8,4	-132,2
4	"	22,7	10,7	-129
5	"	25,9	12,3	-129,5
6	"	30,9	14,6	-126,5
1	Mn^{2+}	4,9	2,3	-131
2	"	10	4,7	-124,6
3	"	13,7	6,5	-133,5
4	"	18,4	8,7	-131,5
5	"	20,4	9,6	-131,4
6	"	24,5	11,6	-130

Tabelle IX

Die stereochemische Spezifität der "Metall-abhängigen" Esterase unter dem Einfluß von Metallionen bei pH=8,0

Die Versuchsansätze von 50 ml enthalten: 4 ml Enzymlösung (wäss. Auszug aus Karpfenfrischlebern), 0,25 g rac. Mandelsäureäthylester, 20 ml Triäthanolamin-HCl-Puffer (0,5m) pH=8,0, Metallsalze in 10^{-2} molarer Konzentration; t = 25,0°C.

Reakt.-Dauer in Std.	Zusatz von	abgespaltene Mandelsäure		
		mg	%	$[\alpha]_D$
6	-	54,8	26	-132
3	Co^{2+}	34,2	16,2	-135,5
6	"	56	26,5	-130
3	Ni^{2+}	21,6	10,3	-118,2
6	"	37,2	17,6	-117
3	Mn^{2+}	14	6,6	-118,5
6	"	26,7	12,4	-117

Tabelle X

Die stereochemische Spezifität der "Metall-abhängigen" Esterase unter dem Einfluß von Metallionen bei pH=8,0

Die Versuchsansätze von 50 ml enthalten: 10 ml Enzymlösung (physiol. NaCl-Auszug aus Acetontrockenpräparat), 0,25 g rac. Mandelsäureäthylester, 20 ml Triäthanolamin-HCl-Puffer (0,5m) pH=8,0, Metallsalze in den angegebenen molaren Konzentrationen; t = 25,0°C.

Enzymlösung	Reakt.-Dauer in Std.	Zusatz von Me^{2+} (Mol/l)	abgespaltene Mandelsäure		
			mg	%	$[\alpha]_D$
Auszug 1	3	-	41,4	19,6	-133,8
	6	-	57,5	27,3	-132
	3	$Co^{2+}10^{-3}$	46,9	22,2	-137
	6	"	76,6	36,3	-130
	3	$Mg^{2+}10^{-3}$	50,2	23,8	-132,2
	6	"	53,6	25,4	-134,8
	3	$Ni^{2+}10^{-3}$	28,6	13,6	-120,5
	6	"	37,6	17,8	-131,3
	3	$Mn^{2+}10^{-3}$	15,8	7,5	-129,1
	6	"	25,6	12,1	-124,8
Auszug 2	3	-	37,8	17,9	-141
	6	-	54,1	25,7	-141,5
	3	$Co^{2+}10^{-4}$	35,6	16,9	-137,6
	6	"	56	26,5	-129,9
	3	$Mg^{2+}10^{-4}$	32,9	15,6	-137
	6	"	53,3	25,2	-131,7
	3	$Ni^{2+}10^{-4}$	29,2	13,8	-138,5
	6	"	44,8	21,2	-133,2
	3	$Mn^{2+}10^{-4}$	16,5	7,8	-139,8
	6	"	28,3	13,4	-127,9

Tabelle XI

Die stereochemische Spezifität der "Metall-abhängigen" Karpfenleberesterase in Gegenwart von Mn^{2+}- und Co^{2+}- bzw. Mg^{2+}-Ionen bei pH=8,0

Die Versuchsansätze von 50 ml enthalten: 1,5 ml Enzymlösung (angereichertes Präparat I aus Karpfenfrischlebern). Reaktionsdauer = 3 Std.; t = 25,0°C.

Zusatz von Me^{2+}(Mol/l)	abgespaltene Mandelsäure		
	mg	%	$[\alpha]_D$
o. Zusatz	6,4	3,1	- 49,9
$Co^{2+}10^{-3}$	46,3	21,9	-132
$Mn^{2+}10^{-4}$	14,6	6,9	-122,2
$Co^{2+}10^{-3}+Mn^{2+}10^{-4}$	15,8	7,5	-123,6
$Co^{2+}10^{-3}+Mn^{2+}10^{-5}$	26,8	12,7	-127
$Mg^{2+}10^{-3}$	38,4	18,2	-135
$Mg^{2+}10^{-3}+Mn^{2+}10^{-4}$	19,2	9,1	-120
$Mg^{2+}10^{-3}+Mn^{2+}10^{-5}$	28,6	13,5	-114,5

Tabelle XII

Der Einfluß der Metallionenkonzentration auf die Aktivität und stereochemische Spezifität der "Metall-abhängigen" Esterase bei pH=8,0

Die Versuchsansätze von 50 ml enthalten: 1 ml Enzymlösung (angereichertes Präparat aus Karpfenfrischlebern), 0,25 g rac. Mandelsäureäthylester, 20 ml Triäthanolamin-HCl-Puffer (0,5m) pH=8,0 und Metallsalze in den angegebenen Konzentrationen. Reaktionsdauer = 3 Std.; t = 25,0°C.

	Co^{2+} Mol/l	abgespaltene Mandelsäure		
		mg	%	$[\alpha]_D$
Präparat 1	-	4,3	2,1	- 49,9
	$1x10^{-4}$	15,8	7,5	-118,5
	$2x10^{-4}$	28,6	13,5	-129,5
	$4x10^{-4}$	28,3	13,4	-136,7
	$1x10^{-3}$	31,7	15	-133
	$2x10^{-3}$	29,2	13,8	-136,5
Präparat 2	Mn^{2+} Mol/l			
	-	8,5	4	- 94,7
	$1x10^{-6}$	14	6,6	-109,5
	$1x10^{-5}$	18,3	8,6	-116,5
	$1x10^{-4}$	17,1	8,1	-122,5
	$1x10^{-3}$	19,5	9,2	-122,5
	$1x10^{-2}$	17,1	8,6	-117,5
Präparat 3	Mg^{2+} Mol/l			
	-	6,1	2,9	- 69,9
	$5x10^{-5}$	15,2	7,2	-106
	$1x10^{-4}$	21,9	10,4	-120,5
	$2x10^{-4}$	25,6	12,1	-124,5
	$4x10^{-4}$	27,4	13	-129
	$1x10^{-3}$	32,2	15,3	-132

Tabelle XIII

Der zeitliche Verlauf der enzymatischen Hydrolyse des rac. Mandelsäureäthylesters unter dem Einfluß von Metallionen bei pH=8,0

Die Versuchsansätze von 50 ml enthalten: 10 ml Enzymlösung (physiol. NaCl-Auszug aus Acetontrockenpräparat), 0,25 g rac. Mandelsäureäthylester, 20 ml Triäthanolamin-HCl-Puffer (0,5m) pH=8,0 und Metallsalze in 10^{-3} molarer Konzentration; t = 25,0°C.

Reakt.-Dauer in Std.	Zusatz von	abgespaltene Mandelsäure		
		mg	%	$[\alpha]_D$
1	Mn^{2+}	6,7	3,1	-139
2	"	10	4,8	-131,2
3	"	15,8	7,5	-129,1
4	"	20	9,4	-118,2
5	"	21,4	10,1	-133,5
6	"	27,1	12,8	-111,5
1	Mg^{2+}	11,9	5,6	-143
2	"	26,8	12,7	-136,5
3	"	42,6	20,2	-139,5
4	"	47,1	22,4	-135,5
5	"	56	26,5	-136
6	"	53,5	25,4	-133,6

Tabelle XIV

Die stereochemische Spezifität der "Metall-abhängigen" Esterase in Abhängigkeit von der Substratkonzentration und von Zusätzen

Die Versuchsansätze von 50 ml enthalten: 10 ml Enzymlösung (physiol. NaCl-Auszug aus Acetontrockenpräparat), 0,125 g bzw. 0,25 g bzw. 0,5 g rac. Mandelsäureäthylester, 20 ml Triäthanolamin-HCl-Puffer (0,5m) pH=8,0 und die angegebenen Zusätze; t = 25,0°C.

Reakt.-Dauer in Std.	Substratkonzentration	Zusatz von	abgespaltene Mandelsäure		
			mg	%	$[\alpha]_D$
2	0,125	-	26,2	24,8	-129,5
4	"	-	32,9	31,1	-129,5
3	0,25	-	33,8	16	-135,6
6	"	-	55,6	26,5	-128,5
12	"	-	82,1	38,9	-121,6
3	0,5	-	43,8	10,7	-127,3
6	"	-	72,5	17,2	-130
3	0,25	Strychninsulfat 100 mg	29,2	13,8	-124
6	"		48,4	22,9	-124,7
3	0,25	Äthanol 100% d.theor. abspaltbaren Menge	35,3	16,8	-136
3	0,25	Mandelsäure 33% d.theor. abspaltbaren Menge	20,4	9,7	-146
6	"		38,6	18,4	-131

Tabelle XV

Die stereochemische Spezifität der "Metall-abhängigen" Esterase unter dem Einfluß von Co^{2+}

Die Versuchsansätze von 50 ml enthalten: Enzymlösung (angereichertes Enzym aus Karpfenfrischlebern, Präparat 1), 0,25 g rac. Mandelsäureäthylester, 20 ml Triäthanolamin-HCl-Puffer (0,5m) pH=8,0 und Kobaltsalze in 10^{-3} molarer Konzentration; t = 25,0°C.

Reakt.-Dauer in Std.	Enzymlösung ml	abgespaltene Mandelsäure		
		mg	%	$[\alpha]_D$
1	1	19,3	9,2	-138,6
2	1	33,2	15,7	-134,4
4	1	53	25,1	-133
1	10	86	40,8	-121,9

Tabelle XVI

Einfluß der Substratkonzentration auf die enzymatische Hydrolyse von L(+)- und D(-)-Mandelsäureäthylester

Die Versuchsansätze von 25 ml enthalten: 5 ml Enzymlösung (physiol. NaCl-Auszug aus Acetontrockenpräparat) und L(+)- bzw. D(-)-Mandelsäureäthylester in der angegebenen molaren Konzentrationen; t = 25,0°C.

-log [S]	In 60 Min. gespaltener D(-)-Ester in mg		In 60 Min. gespaltener L(+)-Ester in mg	
	pH=7,0	pH=8,0	pH=7,0	pH=8,0
2,3	2,73	6,49	0,28	0,52
2,0	4,18	9,34	0,3	0,63
1,7	4,97	12	0,35	0,71
1,3	7,57	17,2	0,48	1,04

Tabelle XVII

Die enzymatische Hydrolyse des D(-)-Mandelsäureäthylesters in Abhängigkeit von der Substratkonzentration und von Zusätzen

Die Versuchsansätze von 25 ml enthalten: 1 ml Enzymlösung (physiol. NaCl-Auszug aus Acetontrockenpräparat), D(-)-Mandelsäureäthylester in den angegebenen molaren Konzentrationen und Metallsalze bzw. AEDTA; t = 25,0°C.

-log [S]	In 60 Min. gespaltener D(-)-Ester in mg pH=8,0			
	ohne Zusatz	Zus. 10^{-3} v. Mg^{2+} Mol/l	Zus. 10^{-3} v. Mn^{2+} Mol/l	Zus. 10^{-3} v. AEDTA Mol/l
2,3	2,53	3,5	1,66	-
2,0	3,44	4,63	2,14	-
1,7	4,65	5,95	2,5	-
1,3	5,45	7,7	3,01	0,41

Tabelle XVIII

Der Einfluß von Schwermetallsalzen und PCMB[+)] auf die stereochemische Spezifität und die enzymatische Aktivität eines Karpfenlebernauszugs bei pH=8,0

Die Versuchsansätze von 50 ml enthalten: 4 ml Enzymlösung (physiol. NaCl-Auszug aus Karpfenfrischlebern), 0,25 g rac. Mandelsäureäthylester, 20 ml Triäthanolamin-HCl-Puffer (0,5m) pH=8,0 und die Zusätze in den angegebenen molaren Konzentrationen. Reaktionsdauer = 6 Std.; t = 25,0°C.

Enzym	Zusatz von Metallsalzen	abgespaltene Mandelsäure			Hemmung des Umsatzes (%)
		mg	%	$[\alpha]_D$	
Auszug 1	-	47,1	22,4	-131,7	0
	$Hg^{2+}10^{-4}$	3,4	1,6	-	92,9
	$Pb^{2+}10^{-4}$	7,9	3,8	- 75,4	83,2
	$Zn^{2+}10^{-4}$	20,1	9,5	- 84,7	57,4
	$Cu^{2+}10^{-4}$	25,3	12	-104,3	46,5
	$Cd^{2+}10^{-4}$	26,2	12,3	-120	44,5
Auszug 2	-	46,3	21,9	-135	0
	$Hg^{2+}10^{-4}$	1,8	0,7	-	99,6
	$Hg^{2+}10^{-5}$	14,6	6,9	-111	68,4
	$Pb^{2+}10^{-4}$	6,1	2,9	- 28	90
	$Pb^{2+}10^{-5}$	31,7	15	- 95,4	47
	$PCMB10^{-4}$	22,5	10,7	-115,2	51,3
	$PCMB10^{-5}$	40,8	19,3	-136,5	12
	$Ca^{2+}10^{-3}$	21	9,7	-105,4	54,5

+) p-Chlormercuribenzoesäure

Tabelle XIX

Der Einfluß von Komplexbildnern und Phosphat auf die stereochemische Spezifität und die enzymatische Aktivität eines Karpfenleberauszugs bei pH=8,0

Die Versuchsansätze von 50 ml enthalten: 5 ml Enzymlösung (physiol. NaCl-Auszug aus Karpfenfrischlebern), 0,25 g rac. Mandelsäureäthylester, 20 ml Triäthanolamin-HCl-Puffer (0,5m) pH=8,0 und die Zusätze in den angegebenen molaren Konzentrationen; t = 25,0°C.

Reakt.-Dauer in Std.	Zusatz von		abgespaltene Mandelsäure			% Hemmung
			mg	%	$[\alpha]_D$	
3	-		29,8	14,1	-127	0
6	-		48,2	22,8	-120	0
3	AEDTA	10^{-3}	2,4	1,2	-	91,5
3	"	10^{-4}	28	13,3	-129,1	5
3	Citronensäure	10^{-2}	14,2	6,7	- 68,8	52,5
3	"	10^{-3}	18	8,5	-116	40
3	"	10^{-4}	27,4	13	-118	7,8
3	Oxalsäure	10^{-2}	18,9	8,9	- 99,3	37
3	"	10^{-3}	24,4	11,5	-117,1	18,5
3	"	10^{-4}	26,2	12,4	-124,5	12
3	$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	$2x10^{-1}$	6,7	3,2	- 76,1	78,6
6	"	$2x10^{-1}$	11,6	5,5	- 73,6	75,9
3	"	$1x10^{-1}$	10,4	4,9	- 98,5	65,3
6	"	$1x10^{-1}$	17,1	8,1	-109,5	64,5
3	"	$1x10^{-2}$	25,6	12,1	-138	14
6	"	$1x10^{-2}$	39,3	18,6	-138,5	18

Tabelle XX

Die Änderung der stereochemischen Spezifität in Abhängigkeit von Alter und Wasserstoffionenkonzentration der Enzymlösungen

Die Versuchsansätze von 50 ml enthalten: 10 ml Enzymlösung (aus Acetontrockenpulver), 0,25 g rac. Mandelsäureäthylester, 20 ml Triäthanolamin-HCl-Puffer (0,5m) pH=7,0. Die Versuchsansätze mit $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ enthalten das Metallsalz in 10^{-2} molarer Konzentration. Reaktionsdauer = 6 Std.; t = 25,0°C.

Enzymlösung	Alter der Enzymlösung in Tagen	Zusatz von	abgespaltene Mandelsäure		
			mg	%	$[\alpha]_D$
ammoniakal. Auszug pH etwa 9	2	-	6,3	2,7	- 88,6
	7	-	11,4	5,4	- 59,7
	2	Co^{2+}	43,4	20,6	-138,3
	7	"	30,6	14,5	-121
	23	"	13,5	6,4	- 72,3
physiol. NaCl-Auszug pH etwa 6,6	2	-	8	3,8	- 84,5
	7	-	12,3	5,8	- 76
	2	Co^{2+}	47,3	22,4	-137,5
	7	"	23,9	11,3	-122,8
	23	"	13,2	6,3	- 77,3
essigsaurer Auszug pH etwa 4,5	2	-	12,9	6,1	- 59,1
	7	-	11,1	5,3	- 72,8
	2	Co^{2+}	31,8	15	-123
	23	"	10,5	5	- 73

Tabelle XXI

Die Änderung der stereochemischen Spezifität in Abhängigkeit vom Alter der Enzymlösung

Die Versuchsansätze von 50 ml enthalten: Enzymlösung in jeweils angegebener Menge, 0,25 g rac. Mandelsäureäthylester, 20 ml Triäthanolamin-HCl-Puffer (0,5m) pH=8,0, $Co^{2+}10^{-3}$ Mol/l. Reaktionsdauer = 3Std.; t = 25,0°C.

	Alter der Enzymlösung in Tagen	abgespaltene Mandelsäure		
		mg	%	$[\alpha]_D$
10 ml phys. NaCl-Auszug aus Acetontrockenpulver	1	43,2	20,2	-142
	8	22,6	10,7	-109
	17	10,7	4,9	- 69,9
4 ml phys. NaCl-Auszug aus Frischlebern	1	41,4	19,6	-131,5
	14	9	4,3	- 69,8
1 ml angereichertes Präparat aus Frischlebern	3	31,4	15	-134
	20	7,5	3,6	- 71,2

Tabelle XXII

Die stereochemische Spezifität der "nicht aktivierbaren" Esterase in Abhängigkeit von der Substratkonzentration und von Zusätzen

Die Versuchsansätze von 50 ml enthalten: 20 ml Enzymlösung (essigsaurer Auszug, dialysiert, aus Acetontrockenpräparat), 0,125 g bzw. 0,25 g bzw. 0,5 g rac. Mandelsäureäthylester, 20 ml Triäthanolamin-HCl-Puffer (0,5m) pH=8,0 und die angegebenen Zusätze; t = 25,0°C.

Reakt.-Dauer in Std.	Substratkonzentration	Zusatz von	abgespaltene Mandelsäure		
			mg	%	$[\alpha]_D$
2	0,125	-	20,7	19,6	- 72
4	"	-	34,7	32,9	- 73,6
3	0,25	-	39,1	18,5	- 78
6	"	-	69,8	33	- 73,2
12	"	-	111,3	52,9	- 57,4
3	0,5	-	49,3	11,7	- 80,2
6	"	-	94,4	22,4	- 79
3	0,25	Strychninsulfat 100 mg	39	18,5	- 78,7
6	"		55,4	26,2	- 74
3	0,25	Äthanol 100% d.theor. abspaltbaren Menge	40,8	19,4	- 73
3	0,25	Mandelsäure 33% d.theor. abspaltbaren Menge	41,1	19,5	- 74,5

Tabelle XXIII

Einfluß von Substratkonzentration und Zusätzen auf die enzymatische Hydrolyse von L(+)- und D(-)-Mandelsäureäthylester bei pH=8,0

Die Versuchsansätze von 25 ml enthalten: 5 ml Enzymlösung (essigsaurer Auszug, dialysiert aus Acetontrockenpräparat) L(+)- bzw. D(-)-Mandelsäureäthylester in den angegebenen molaren Konzentrationen und Metallsalze bzw. AEDTA; t = 25,0°C.

-log [S]	In 60 Min. gespaltener D(-)-Ester in mg		
	o. Zusatz	Zusatz von Mg^{2+} 10^{-3} Mol/l	Zusatz von AEDTA 10^{-3} Mol/l
2,3	3,18	-	-
2,0	4,67	-	-
1,7	6,6	6,5	6,4
1,3	8,2	-	-
-log [S]	In 60 Min. gespaltener L(+)-Ester in mg		
	o. Zusatz	Zusatz von Mg^{2+} 10^{-3} Mol/l	Zusatz von AEDTA 10^{-3} Mol/l
2,3	1,39	-	-
2,0	1,82	-	-
1,7	2,55	2,4	2,5
1,3	3,42	-	-

C. Diskussion der Ergebnisse

I. Ist in der Leber des Karpfens die Leberesterase mit Pankreaslipase vergesellschaftet?

Obwohl in der Leber des Karpfens Bauchspeicheldrüse als "Pankreas diffusum" vorhanden ist und man dementsprechend mit der Anwesenheit einer "Lipase" neben der Leberesterase rechnen muß, schließen unsere Versuche die Anwesenheit einer "Lipase" aus. Demzufolge wird durch die von uns benutzten Merkmale ausschließlich die Leberesterase charakterisiert.

II. Die Rolle der Metallionen bei der enzymatischen Hydrolyse

Die im Vergleich zu anderen Esterasen überraschend stark ausgeprägte Selektivität der Karpfenleberesterase in Bezug auf die Spaltung des D(-)-Isomeren des racemischen Mandelsäureäthylesters ist auf die Gegenwart von Metallionen[+)] zurückzuführen.

Entsprechend der Stärke und der Art der Metall-Protein-Bindung in den Metall-abhängigen Enzymkomplexen unterscheidet man gegenwärtig zwei Typen (27):

[+)] Die als wirksam erkannten Co(II)-, Mg -, Ni(II)- und Mn(II)-Verbindungen üben für sich allein keine katalytische Wirkung aus. Demgegenüber besitzen bestimmte Nebengruppenelemente die Fähigkeit zur katalytischen Zerlegung von Carbonsäureestern (E. Bamann und Mitarbeiter (12)).

Die **Metallo-Enzyme** sind durch eine große Festigkeit der Metall-Protein-Bindung gekennzeichnet. Dabei dürften die essentiellen Metallionen über eine Chelatbindung mit den Aminosäuren des aktiven Zentrums verbunden sein. Bei genügend reinen Enzymen besteht ein stöchiometrisches Verhältnis zwischen Metallgehalt und Enzymprotein. Die hohe Selektivität dieses Enzymtyps für L-konfigurierte Substrate führt man auf die Bildung optisch aktiver Chelate zurück (23).

Weniger übersichtlich sind die Verhältnisse bei den **Metall-Enzym-Komplexen**, zu denen diejenigen Metall-abhängigen Enzyme gezählt werden, bei denen die Bindung der Metallionen an das Protein sehr labil ist (27). Es ist deshalb im Gegensatz zu den **Metallo-Enzymen** nicht möglich, den aktiven Enzymkomplex zu isolieren und das essentielle Metallion sicher zu bestimmen. Nach Entfernung der wirksamen Metallionen verbleibt meistens eine restliche enzymatische Aktivität.

Die eingangs erwähnte Selektivität der Karpfenleberesterase kommt dadurch zustande, daß sich die Anwesenheit von Metallionen praktisch nur auf die D(-)-Esterspaltung – und dies in Form einer starken **Umsatzsteigerung** – auswirkt. Dementsprechend führt der Entzug von Metallionen zu einer Verringerung der D(-)-Esterspaltung, wodurch es zu einer Verminderung der Selektivität kommt. Der Umsatz des L(+)-Esters dagegen ist weitgehend unabhängig von der Anwesenheit von Metallionen. Diese Folgerungen finden in den Ergebnissen der Versuche mit den beiden optischen Antipoden des Racemats in An- und Abwesenheit von Metallsalzen ihre Bestätigung.

Der Aktivitätsverlust bei der Anreicherung des Enzyms, aufhebbar durch Zugabe wirksamer Metallsalze, die Abhängigkeit der stereochemischen Spezifität von der

Herstellungsart der Enzymlösungen[+)] (alkalische bzw. saure Extraktion), der Einfluß von Puffer, Zusätzen und Reaktion der Versuchsansätze sind eine Folge des Verlustes bzw. des Grades der Abdissoziation natürlich vorhandener Metallionen. Ihre Bindung an das Enzymprotein kann nur eine lose sein. Dieses Merkmal klassifiziert die "Metall-abhängige" Karpfenleberesterase im Sinne der von B.L. Vallee (27) vorgeschlagenen Nomenklatur als Metall-Enzym-Komplex.

Aus unseren Befunden in pufferfreien Versuchen bei verschiedenen pH-Werten schließen wir, daß die Protein-Metall-Bindung in schwach alkalischem Milieu optimal ist. Mit zunehmender Wasserstoffionenkonzentration erfolgt stärkere Dissoziation der Metallionen. Sie ist die Ursache für die Änderung der Selektivität des Enzyms. So betragen bei vergleichbaren Spaltungsgraden die $[\alpha]_D$-Werte bei pH=8,0 bzw. =7,0 bzw. =6,0: -137^o bzw. $-130,2^o$ bzw. -53^o (Tab. V). Durch Zugabe wirksamer Metallionen kommt es andererseits zu einer Zurückdrängung der Dissoziation der Metallionen und damit zu einer Erhöhung der Selektivität.

Die Befunde anderer Autoren bezüglich Abhängigkeit des pH-Optimums "Metall-aktivierbarer" Enzyme von der Metallionenkonzentration sind ebenfalls durch den jeweiligen Grad der Dissoziation des Metall-Enzym-Komplexes zu erklären (13,17).

+) Gleich gut wirksame Enzymlösungen – unabhängig davon, ob Ammoniaklösung oder Essigsäure als Extraktionsmittel dienen – erhält man nach E. Bamann und J.N. Mukherjee (10) im Falle der Leberesterase des Schweins. Bei dieser Esterase besteht kein Bedarf an Metallionen, ihre Selektivität ist konstant, d.h. sie ist nicht abhängig vom Reinheitsgrad der Esterase (30).

Bei der Überprüfung der meisten Elemente des Periodensystems haben wir an unvorbehandelten Enzymlösungen und an solchen, die durch mehrere Vornahmen von den natürlichen Metallsalzen weitgehend befreit waren, die Verbindungen von Co^{2+}, Mg^{2+}, Ni^{2+} und Mn^{2+} als einflußnehmend auf Aktivität und Selektivität der Karpfenleberesterase erkannt. Dabei treten quantitative Unterschiede in der Wirkung zu Tage. Bei pH=6,0 ist die Steigerung der Aktivität und der Selektivität am stärksten. Dies ist mit einer Zurückdrängung der verhältnismäßig starken Abdissoziation der natürlich vorhandenen Metallionen vom Enzymprotein zu erklären. Die Besonderheiten in den Versuchsansätzen bei pH=8,0 sind in Folgendem zu sehen: Im Falle des Mn^{2+} genügt bereits eine Metallionenkonzentration entsprechend 10^{-5} Mol/l, um die maximale Spaltung des racemischen Mandelsäureäthylesters zu erreichen, bei höheren Mangankonzentrationen ($>10^{-2}$ Mol/l) sinkt der Umsatz. Die selektivitätssteigernde Wirkung des Mn^{2+} ist aber geringer als die des Co^{2+} und des Mg^{2+}. Bei gleichzeitiger Anwesenheit von Mn(II)- und Co(II)- bzw. Mg - Salzen ist der Umsatz gegenüber demjenigen in Kobalt- oder Magnesiumversuchen verringert (Tab. XI). Das bedeutet, daß das höheraffine Mangan die anderen Metallsalze, darunter auch die natürlichen, die in unvorbehandelten Auszügen aus Frischleber oder Acetontrockenpräparaten enthalten sind, vom Enzymeiweiß verdrängt oder sich mitanlagert (Tab. V,IX, X).

Bei den wenigeraffinen Co(II)- und Mg-Salzen werden die optimalen Verhältnisse – sowohl hinsichtlich des Umsatzes als auch der Selektivität – erst bei Konzentrationen, die eine oder zwei Zehnerpotenzen höher liegen wie diejenige des Mangans, erreicht.

Im Falle der Ni(II)-Ionen, die ungereinigte Esterase bei pH=7,0 aktivieren, besteht die Besonderheit, daß sie wohl als hochaffin zum Enzymeiweiß gelten müssen, weil sie sich ähnlich wie Mn^{2+} bei pH=8,0 an das Enzym anlagern, wobei Hemmung auftritt (Tab. V,IX,X), sich aber als nicht geeignet erweisen, in gereinigten Esterasepräparaten, die einen weitgehenden Verlust der natürlichen Metallionen erlitten haben, deren Aktivität und Selektivität zu beeinflussen.

Daß der Effekt aktivierender Ionen mit dem Reinheitsgrad und dem Alter des Enzyms variieren kann, ist auch anderweitig beobachtet worden. So wird die teilgereinigte Arginase durch Kobalt(II)- und Mangan(II)-Ionen aktiviert, das hochgereinigte Enzym aber nur durch Mangan(II)-Ionen (2).

Über die Wirkung von Verbindungen, die mit Metallionen reagieren und diese dem Enzymeiweiß mehr oder weniger entziehen, lassen unsere Versuche folgende Aussagen zu: Von Einfluß ist, wenn es sich um Komplexbildner handelt, deren Stärke. AEDTA hemmt das "Metall-abhängige" Enzym überaus stark: Bei der verbleibenden Spaltung von 2 bis 3% mißt man anstelle der hohen negativen Drehung (entsprechend $[\alpha]_D = -130^\circ$) nur eine geringe oder überhaupt keine. Von gleichzeitigem Einfluß auf die Auswirkung der Metall-bindenden Substanzen ist das pH des Reaktionsmilieus. So resultieren bei Anwesenheit von Phosphatpuffer pH=8,0 bzw. =7,0 bzw. =6,0 folgende Versuchsdaten:

pH=8,0	6 Std.	9%	$[\alpha]_D = -45,1^\circ$
pH=7,0	12 Std.	6,2%	$[\alpha]_D = +51,8^\circ$
pH=6,0	24 Std.	7,3%	$[\alpha]_D = +107^\circ$

Offensichtlich nimmt der Entzug der Metallionen von pH=8,0 über pH=7,0 zu pH=6,0 zu. Dies ist verständlich, da nach unseren vorausstehenden Darlegungen die Abdissoziation der Metallionen aus dem Enzymeiweiß mit zunehmender Wasserstoffionenkonzentration ansteigt.

Der Komplexbildner Triäthanolamin[+)], der in Form von Triäthanolamin-HCl-Puffer in schwach alkalischem und neutralem Milieu Anwendung finden kann, entzieht bei pH=8,0 dem Enzymeiweiß das assoziierte Metall nicht, bei pH=7,0 dagegen kann man auf Grund der veränderten $[\alpha]_D$-Werte und des stark herabgeminderten Racematumsatzes sowohl auf eine Hemmung der (-)- wie (+)-Esterspaltung schließen. Diese Hemmung kann durch Zugabe einer genügenden Menge wirksamer Metallsalze beseitigt werden (Tab. VI,VII,VIII).

Die Hemmung durch Schwermetallsalze, von der man weiß, daß sie in verschiedenen Erscheinungen auftreten kann, läßt sich in unserem Fall im Zusammenhang mit den anderen Befunden als eine Verdrängung der wirksamen Metallionen auf Grund größerer Affinitäten der Schwermetallsalze zum Enzymprotein erklären.

+) Die komplexbildenden Eigenschaften von Triäthanolamin mit Kobalt(II)- und Nickel(II)-Salzen sind von W. Hieber und E. Levy (19), die Komplexe mit Magnesium-, Strontium- und Calcium-Salzen von F. Garelli und A. Tettamanzi (16) beschrieben worden.

III. Überlegungen zum Auftreten einer zweiten Esterase in "gealterten" Enzymlösungen

Die Stabilität der "Metall-abhängigen" Esterase ist begrenzt. Der im Laufe der Zeit eintretende Rückgang der Aktivität und Selektivität sowie das Verbleiben einer esteratischen Restaktivität mit geänderter Selektivität bedürfen einer Erklärung.

Der geschilderte Vorgang kann nicht darin bestehen, daß eine zeitlich bedingte Inaktivierung vor sich geht, weil sich diese nur in einer Verminderung des Gesamtumsatzes des Substrates äußern würde.

Zur Erklärung des beobachteten Phänomens analysieren wir zwei Möglichkeiten:

1) Die Enzymauszüge enthalten z w e i Esterasen unterschiedlicher Stabilität. Das Enzym geringerer Haltbarkeit wäre eine "Metall-abhängige" Esterase mit einer ausgeprägten Selektivität in Bezug auf den D(-)-Mandelsäureäthylester, wohingegen das zweite, beständige, aber "nicht aktivierbare" Enzym im racemischen Substrat zwar auch den D(-)-Ester bevorzugt aber nicht so selektiv spalten würde wie die "Metall-abhängige" Esterase. Da die Restaktivität in gealterten Enzymlösungen (Tab. XXI) wesentlich geringer ist als die ursprüngliche Aktivität, könnte die im Falle frischer Lösungen isolierte optisch hochaktive Mandelsäure ($[\alpha]_D$ um -135°) auf die mengenmäßig weit überwiegende "Metall-abhängige" Esterase zurückzuführen sein. Diese einleuchtende Erklärung steht aber zu einigen Befunden im Widerspruch:

a) Die esteratische Aktivität von Enzymlösungen, die die "Metall-abhängige" Esterase enthalten, wird durch AEDTA (10^{-3} Mol/l) fast v o l l s t ä n d i g gehemmt (Tab. XIX). Das dürfte nicht eintreten, wenn neben dem hemmbaren Enzym das zweite – wie sich ergeben hat – durch AEDTA n i c h t z u h e m m e n d e Enzym vorhanden wäre.

b) Wie durch AEDTA, so erfolgt auch durch Quecksilber(II)-Chlorid (10^{-4} Mol/l) in frischen Lösungen praktisch totale Hemmung (Tab. XVIII). Vom "nicht aktivierbaren" Restenzym wissen wir aber, daß es durch das Quecksilbersalz ebensowenig gehemmt wird wie durch AEDTA.

c) Schonende Trennungsvornahmen an DEAE-Cellulose sowie an dem Dextrangel Sephadex führten nie zu zwei oder mehreren esteratisch wirksamen Fraktionen. Die einzige auftretende Fraktion enthielt stets die "Metall-abhängige" Esterase mit dem gleichen Selektivitätsgrad wie das ursprünglich zur Verwendung gekommene Enzymkonzentrat.

2) Für die Alterungsvorgänge, die sich im Wesentlichen durch eine Abnahme der Aktivität und später durch einen Stillstand des Aktivitätsverlustes sowie durch eine Veränderung der Selektivität bis zu einem konstanten Endpunkt manifestieren, kann eine s t r u k t u r e l l e Ä n d e r u n g[+)] des g e n u i n e n

---

[+)] Im Ricinussamen liegt eine Lipase vor, die während der Samenkeimung infolge proteolytischen Abbaus ihre Eigenschaften ändert (36). Auch im Falle der Leberesterase (Mensch, Kaninchen) kann durch die Einwirkung proteolytischer Enzyme das Enzymprotein so verändert werden, daß – allerdings nur geringe – Änderungen im optischen Auswählen die Folge sind (7).

E n z y m p r o t e i n s verantwortlich sein. Von diesem Prozeß wissen wir, daß er sich in schwach alkalischem und neutralen Milieu langsam vollzieht und daß saures Medium beschleunigend wirkt. Essigsaure Auszüge beispielsweise enthalten bereits nach drei Tagen den Endzustand des Enzymproteins. Dieser ist durch folgendes Verhalten charakterisiert:
Die Affinität zum L(+)-Isomeren beträgt etwa die Hälfte verglichen mit der Affinität des Enzyms im Anfangszustand. Die Affinität zum D(-)-Isomeren ist kaum verändert, dagegen ist die Zerfallsgeschwindigkeit der Reaktionszwischenverbindung im Endzustand des Enzyms auf etwa ein Achtel zurückgegangen. Wesentlicher aber in der Beurteilung des Endzustandes des Enzyms erscheint, daß die ursprünglich aktivierenden bzw. hemmenden Metallionen praktisch ohne Einfluß sind. Da AEDTA ohne Wirkung bleibt, dürfen wir annehmen, daß Metallionen für die Spaltung des Esters belanglos sind. Die Konstanz des entstandenen Enzyms deutet auf einen Abschluß in der strukturellen Umwandlung hin.
Freilich muß noch der Tatsache Rechnung getragen werden, daß die genuine Esterase durch E 600 nicht gehemmt wird, während das durch Alterung strukturell veränderte Enzym in seiner Aktivität und Selektivität bei Zusatz von E 600 beeinflußt wird. Man muß demnach annehmen, daß der Serinrest im aktiven Zentrum des genuinen Enzyms blockiert ist und die strukturelle Änderung im Laufe der Alterung sich auch hier auswirkt, indem der Serinrest frei und im Endzustand des Enzymproteins einer Phosphorylierung durch E 600 zugänglich wird, was die bekannte E 600 - Hemmung zur Folge hat (24,25).

D. Methodik

1. Enzymmaterial

a) Frischorgane, Trockenpräparate, Enzymlösungen

Den Karpfen wurde sofort nach dem Töten der Bauchhöhleninhalt entnommen und die Leber herauspräpariert. Wir bewahrten die Lebern in 150 g-Portionen tiefgekühlt (-20°C) auf oder bereiteten daraus ein Trockenpulver.

Die Verarbeitung der Frischlebern zu Trockenpulver erfolgte nach dem Verfahren von R. Willstätter und E. Waldschmidt-Leitz (37) und R. Willstätter, E. Bamann und J. Waldschmidt-Graser (30).

Als Enzymlösungen für die Untersuchung der "Metallabhängigen" Esterase dienten Auszüge mit n/40 Ammoniaklösung oder mit physiologischer NaCl-Lösung aus den Acetontrockenpräparaten (i.V. 1:50) und den Frischorganen (i.V. 1:4).

Für die Gewinnung von Enzymlösungen aus Frischlebern homogenisierten wir dieselben zunächst 3 Minuten in der eiskalten Extraktionsflüssigkeit (Ultraturrax von Janke und Kunkel). Nach einstündigem Stehen bei 0°C wurde das Homogenat in einer Ultrazentrifuge (Spinco L) unter Kühlung aufgeteilt (15 000 UPM, 30 Min., Rotor 21). Der klare Überstand dient entweder direkt oder nach der Dialyse (18 Std. gegen Triäthanolamin-HCl-Puffer (0,005m) pH=8,0 bei +5°C) für die Spaltungsversuche.

Die "nicht aktivierbare" Esterase gewinnen wir durch

Extraktion der Acetontrockenpulver mit n/40 Essigsäure (i.V. 1:50) und anschließende Dialyse.

b) Anreicherung des Enzyms

Eine Anreicherung der Esterase aus den Frischlebern geschah durch fraktionierte Ammoniumsulfat- sowie durch Essigsäure-Fällung. Der Eiweißgehalt der einzelnen Fraktionen wurde nach der Biuretmethode (14) bestimmt. Zunächst stellten wir in der beschriebenen Weise einen Frischauszug her und brachten diesen mit 1 N Kalilauge auf pH=8,0. Anschließende Eiweißfällung erfolgte bei -5°C durch sehr langsame Zugabe von feinst gepulvertem Ammoniumsulfat (p.A.). Das bei 50% Sättigung ausgefallene Protein wurde in der Ultrazentrifuge abgetrennt; es war esteratisch kaum wirksam (Fraktion A). Den klaren Überstand sättigten wir mit Ammoniumsulfat zu 80%. Nach einstündigem Stehen unter gelegentlichem Umrühren wurde der Niederschlag abzentrifugiert (15 000 UPM, 30 Min., Rotor 21), in wenig Triäthanolamin-HCl-Puffer (0,005m) pH=8,0 gelöst und gegen diesen Puffer im Kühlraum etwa 18 Std. dialysiert (Fraktion B). Anschließend dialysierten wir Fraktion B eine Stunde gegen n/100 Essigsäure, zentrifugierten das ausgefällte Protein unter Kühlung ab und stellten sofort mit 1 N Kalilauge pH=8,0 wieder her. Die Enzymlösung (Fraktion C) wurde darauf 12 Std. im Kühlraum gegen Triäthanolamin-HCl-Puffer (0,005m) pH=8,0 dialysiert.
Um das Enzym in eine haltbare Form zu überführen, fällten wir Fraktion B oder C mit genügend eiskaltem Aceton (-20°C). Das feine braune Pulver sammelten wir auf einer Filternutsche. Es wurde mit einem Aceton-Äther-Gemisch 1:1 gewaschen, abgepreßt und auf Filtrierpapierbögen getrocknet.

Gelegentliche Gefriertrocknungen der angereicherten Fraktionen wurden in der Gefriertrockenanlage der Firma WKS, Bensheim, durchgeführt (Heiztemperatur nicht über $0^{o}C$).

c) Fraktionierung der Enzymlösung an Sephadex

Nach 3tägigem Quellen von Sephadex 200 (Pharmacia Uppsala) äquilibrierten wir das Gel einen Tag in dem zur Elution verwendeten Puffer (Triäthanolamin-HCl-Puffer (0,01m) pH=8,0). Das im Puffer aufgeschwemmte Gel wurde dann 1 Stunde an der Wasserstrahlpumpe evakuiert, um eingeschlossene Luft zu entfernen, und in ein Glasrohr (40 cm lang, Durchmesser 2,7 cm), dessen Ausfluß mit Glaswolle abgedichtet war, vorsichtig eingefüllt. Auf das abgesetzte Gel trugen wir 5 bis 10 ml eines angereicherten Enzympräparates auf. Danach begann im Kühlraum die Elution der Proteine. Wir wählten eine Durchlaufgeschwindigkeit von 18 ml/Std. Die aus der Säule austretende Lösung passiert eine Meßzelle (UV-Lampe der Wellenlänge 253,7 mμ), die mit einem Schreiber verbunden ist, und wird dann in 6 ml-Fraktionen von einem automatischen Drehstand aufgefangen. Der Schreiber registriert Veränderungen in der Durchlässigkeit (D). Wir verwendeten die Apparate der LKB Produkter AB Stockholm, bestehend aus Miniflow Pumpe, Uvicord Kontroll Einheit, Schreiber, Verteiler und automatischem Drehstand.
Nach den Aufzeichnungen des Schreibers wurden mehrere Fraktionen vereinigt und in Versuchsansätzen mit racemischem Mandelsäureäthylester (Co^{2+} 10^{-3} Mol/l, pH=8,0) auf enzymatische Aktivität geprüft.

d) Fraktionierung der Enzymlösung an DEAE-Cellulose (Serva)

20 g DEAE-Cellulose äquilibrierten wir nach den Angaben des Herstellers einen Tag in Triäthanolamin-HCl-Puffer (0,01m) pH=8,0. Diese Menge ergab eine Säule von 10 cm Länge und 2,7 cm Durchmesser. Auf diese brachten wir 10 ml des Enzymkonzentrates, das vorher genügend gegen den Säulenpuffer dialysiert worden war. Zur Elution verwendeten wir einen Kochsalzgradienten (diskontinuierlich). Das Enzym wird mit 0,01m NaCl in 0,01m Triäthanolamin-HCl-Puffer pH=8,0 abgelöst. (Dosierung und Apparatur wie bei den Sephadex-Versuchen).

2. Versuchsansatz

Die Zusammensetzung der Versuchsansätze ist jeweils im Kopf der Tabellen angegeben, Versuchstemperatur=25,0°C. Der verwendete Mandelsäureäthylester war induktionsfrei (32).
An Effektoren wurden geprüft: $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, $NiCl_2 \cdot 6H_2O$, $MgCl_2 \cdot 5H_2O$, $MnSO_4 \cdot H_2O$, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, $CdSO_4 \cdot 8/3H_2O$, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, $PbCO_3$, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, $HgCl_2$, Zitronensäure, Oxalsäure, Di-Natriumhydrogenphosphat, Äthylendiamintetraacetat (alle Substanzen p.A. Merck), p-Chlormercuribenzoesäure-Natriumsalz, rein (Serva), Diäthyl-p-nitrophenylphosphat (E 600 Bayer 99% rein). In den Hemmversuchen mit AEDTA bzw. E 600 waren Enzymlösung und Zusatzstoff 30 bzw. 60 bis 180 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert.

3. Aufarbeitung des Versuchsansatzes

Die Gewinnung des Spaltungsproduktes Mandelsäure erfolgte nach den Angaben von E. Bamann und P. Laeverenz (6). Die Eigenhydrolyse des racemischen Mandelsäure-

äthylesters bei pH=7,0 und pH=8,0 kommt im Versuch zum Abzug. Die optische Drehung der isolierten Mandelsäure ist im "Lichtelektrischen Präzisionspolarimeter 0,005°" der Firma C. Zeiss bestimmt.

4. Methodik und Versuchsansatz mit den stereoisomeren Estern

Die stereoisomeren Ester wurden nach E. Fischer und A. Speier (15) aus den reinen, optisch aktiven Mandelsäuren

$[\alpha]_D^{20°}$ L(+)-Mandelsäure: +156°
$[\alpha]_D^{20°}$ D(-)-Mandelsäure: -155,5°

hergestellt.

$[\alpha]_D^{20°}$ L(+)-Mandelsäureäthylester: +200,5° (in CS_2)
$[\alpha]_D^{20°}$ D(-)-Mandelsäureäthylester: -206° (in CS_2)

Den Fortgang der Spaltung haben wir bei pH=7,0 bzw. =8,0 unter Verwendung eines Radiometers durch Titration mit 0,025 N Kalilauge gemessen, t = 25,0°C. Die Eigenspaltung der Ester ist in den Ergebnissen berücksichtigt.

E. Zusammenfassung

In der Leberesterase des Karpfens ist uns ein Enzym begegnet, das in seinem Verhalten eigenartige und von den bisherigen Kenntnissen dieser Enzymgruppe abweichende Erscheinungen aufweist. Eine eingehende Analyse gestattet uns jedoch die Einsicht in den besonderen Charakter des Enzyms, die eine Erklärung seines Verhaltens in sich schließt.

1) Obwohl beim Karpfen Teile der Bauchspeicheldrüse als "P a n c r e a s d i f f u s u m" in die Leber eindringen, enthält das Organ nur e i n Enzym, das sich als "Esterase" charakterisieren läßt. Eine "Lipase", wie man sie bei der Pankreasdrüse der Säugetiere oder auch von Haifischen kennt, findet sich nicht.

2) In den Organauszügen hat man es je nach Alter oder nach Art ihrer Darstellung (ammoniakalische bzw. saure Auszüge) mit zwei Esterasen von unterschiedlichen Eigenschaften zu tun. Die beiden Esterasen sind jedoch zu Anfang nicht unabhängig nebeneinander vorhanden; vielmehr geht die zweite durch Strukturumwandlung aus der ersten hervor.

3) Das genuine Enzym erweist sich als ein M e t a l l - P r o t e i n - K o m p l e x. Eine der auffallendsten Eigenschaften ist seine stark ausgeprägte Selektivität für das D(-)-Isomere bei der Spaltung des racemischen Mandelsäureäthylesters. Die L(+)-Esterspaltung ist verhältnismäßig gering und von den vorhandenen oder zugesetzten Metallsalzen praktisch unabhängig.

4) Die Dissoziation des Metall-Protein-Komplexes ist am geringsten im schwach alkalischen Milieu (pH um 8,0). In nicht zu großen Verdünnungen genügt die Konzentration der natürlichen Metallionen für die Erreichung der maximalen Aktivität und Selektivität.

5) Die stark verringerte Aktivität und Selektivität in schwach saurem Milieu ist eine Folge der Abdissoziation wirksamer Metallionen.

6) Die "Metall-abhängige" Esterase läßt sich bei Verarmung an natürlichen Metallsalzen sowie in schwach saurem Milieu in ihrer Aktivität und Selektivität durch Zusatz von Co(II)-, Mg-, Ni(II)- und Mn(II)-Ionen steigern.

7) Komplexbildner und Schwermetalle hemmen vor allem die D(-)-Esterspaltung, indem sie mit den natürlich vorhandenen Metallionen reagieren bzw. diese vom Enzymeiweiß verdrängen.

8) Die Stabilität der "Metall-abhängigen" Esterase ist infolge Übergangs zum "nicht aktivierbaren" Enzym begrenzt.

9) Das aus der genuinen Esterase hervorgegangene zweite Enzym ist von weit geringerer Selektivität. Metallsalze sind für die Spaltung des Esters wirkungslos. Dementsprechend beeinflussen auch Komplexbildner das Enzym in seiner Aktivität und Selektivität nicht. Die Wasserstoffionenkonzentration wirkt sich – anders als beim genuinen Enzym – auf das optische Auswählen nicht aus.

10) Die "nicht aktivierbare" Esterase weist einen reaktiven Serin-Rest im aktiven Zentrum auf, der im genui-

nen Enzym vermutlich blockiert ist. Dies wird aus dem Verhalten gegenüber E 600 geschlossen, das dieses Enzym als B-Typ nach Aldridge charakterisiert.

11) Das "nicht aktivierbare" Enzym ist über viele Wochen beständig. Seine Aktivität und Selektivität verändern sich nicht.

12) Die optische Spezifität beider Esterasen wird aus den Dissoziationskonstanten und Hydrolysengeschwindigkeiten der Reaktionszwischenprodukte erklärt.
Bei der "Metall-abhängigen" Esterase betragen die K_m-Werte:
$5{,}4 \cdot 10^{-3}$ für die Esterase(+)-Esterverbindung und
$9{,}5 \cdot 10^{-3}$ für die Esterase(-)-Esterverbindung.
Umgekehrt zerfällt aber die Esterase(-)-Esterverbindung 20mal rascher als die Esterase(+)-Esterverbindung.
Bei der "nicht aktivierbaren" Esterase ergibt sich für K_m(+)-Ester und K_m(-)-Ester der gleiche Wert von $1 \cdot 10^{-2}$. Das Verhältnis der maximalen Zerfallsgeschwindigkeiten der Enzym(+)-Esterverbindung und Enzym(-)-Esterverbindung beträgt 1:2,5.

F. Literaturverzeichnis

1) Aldridge, W.N.: Bioch. J. 53, 110 (1953)

2) Bach, S.J. and D.B. Whitehouse: Bioch. J. 57, XXXI (1954)

3) Bamann, E.: Ber.dtsch.chem.Ges. 62, 1538 (1929)

4) Bamann, E. u. R.Ammon, in: E. Bamann und K. Myrbäck, Die Methoden der Fermentforschung Bd. 2 Georg Thieme Verlag, Leipzig 1941, New York 1945, S.1713

5) Bamann, E. u. Ch. Feichtner: Bioch. Z. 288, 315 (1936)

6) Bamann, E. u. P. Laeverenz: Ber.dtsch.chem.Ges. 63, 394 (1930)

7) Bamann, E. u. P. Laeverenz: Ber.dtsch.chem.Ges. 63, 29 39 (1930)

8) Bamann, E. u. P. Laeverenz: Ber.dtsch.chem.Ges. 64, 897 (1931)

9) Bamann, E. u. P. Laeverenz: Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 223, 185 (1934)

10) Bamann, E. u. J.N. Mukherjee: Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 229, 1 (1934)

11) Bamann, E., E. Ullmann u. H. Gebler: Hoppe-Seyler's Z. physiol.Chem. 319, 167 (1960)

12) Bamann, E., M. Winkler-Steber u. H. Trapmann: Arch. Pharmaz. Ber.dtsch.pharmaz.Ges. 293/65, 175 (1960)

13) Beers, J.R.F.: Bioch. J. 66, 686 (1957)

14) Beisenherz, G., T.H. Bücher, J.H. Boltze, R. Czok, K.H. Garbade, E. Meyer-Arendt, G. Pfleiderer: Z. Naturforschung 8b, 555 (1953)

15) Fischer, E. u. A. Speier: Ber.dtsch.chem.Ges. 28, 3252 (1895)

16) Garelli, F. u. A. Tettamanzi, in: Estratti Dagli, Atti della Reale Accademia delle Science di Torino 68, 502 (1932/33)

17) Greenberg, J. and N. Lichtenstein: J. biol.Chem. 234, 2337 (1959)

18) Heuschmann, O.: Die Weißfische, Handbuch d. Binnenfischerei Mitteleuropas Bd. II v. Dr. R. Demoll u. Dr. H.N. Maier, Stuttgart 1957

19) Hieber, A. u. E. Levy: Liebigs Ann.Chem. 500, 14 (1933)

20) Krisch, K.: Bioch. Z. 337, 546 (1963)

21) Lineweaver, H. and D. Burk: J. Amer.chem.Soc. 56, 658 (1934)

22) Maier, Ch.: Z. f. Fischerei 1961, 29

23) Martell, A.E. u. M. Calvin: Die Chemie der Metallchelatverbindungen, Verlag Chemie, Weinheim 1958 S. 362-373

24) Costerbaan, R.A., H.S. Jansz and J.A. Cohen: Biochim. biophys. Acta 20, 402 (1956)

25) Schaffer, N.K., C.S. May and W.H. Summerson: J. biol. Chem. 202, 67 (1953)

26) Schwab, G.M., E. Bamann u. F. Laeverenz: Hoppe-Seyler's Z. physiol.Chem. 215, 121 (1933)

27) Vallee, B.L., in: Advances in Protein Chemistry Vol.X Academic Press, New York 1955, p. 317

28) Vonk, H.J.: Z. vergleich.Physiol. 5, 445 (1927)

29) Willstätter, R., in: Untersuchungen über Enzyme Bd. II Julius Springer Verlag, Berlin 1928 Seite 1329

30) Willstätter, R., E. Bamann u. J. Waldschmidt-Graser: Hoppe-Seyler's Z. physiol.Chem. 173, 155 (1928)

31) Willstätter, R., R. Kuhn u. E. Bamann: Ber.dtsch.chem. Ges. 61, 886 (1928)

32) Willstätter, R., R. Kuhn, O. Lindt u. F. Memmen: Hoppe-Seyler's Z. physiol.Chem. 167, 303 (1927)

33) Willstätter, R. u. F. Memmen: Hoppe-Seyler's Z. physiol.Chem. 129, 1 (1923)

34) Willstätter, R. u. F. Memmen: Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 138, 216 (1924)

35) Willstätter, R. u. F. Memmen: Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 133, 229 (1924)

36) Willstätter, R. u. E. Waldschmidt-Leitz: Hoppe-Seyler's Z. physiol.Chem. 134, 161 (1924)

37) Willstätter, R. u. E. Waldschmidt-Leitz: Hoppe-Seyler's Z. physiol.Chem. 125, 132 (1923)

Lebenslauf

Renate Vöcks	geboren am 6. Oktober 1934 in Beuthen, Oberschlesien. Vater, Edgar Vöcks, 1. Direktor der Landesversicherungsanstalt Braunschweig Mutter, Helene, geb. Piernikarczyk, gest. 1942
Schulbildung und beruflicher Werdegang:	1941 - 1947 Volksschule Von 1944-1946 lebten wir in Grüssau, Niederschlesien, unter russisch-polnischer Besatzung. In diesen Jahren waren die deutschen Schulen geschlossen. 1947 - 1956 höhere Schule März 1956 Reifeprüfung an der Ricarda-Huch-Mädchenoberschule in Braunschweig. 1956 - 1958 Apothekenpraktikum, beendet am 11. März mit der pharmazeutischen Vorprüfung. 1958 - 1961 Studium der Pharmazie an der Technischen Hochschule in Braunschweig, 21. April 1961 pharmazeutische Prüfung. Nach halbjähriger praktischer Tätigkeit zur Erlangung der Bestallung als Apothekerin, Studium der Lebensmittelchemie an der Johann-Wolfgang Goethe Universität in Frankfurt. 21. Februar 1963 Lebensmittelchemikerhauptprüfung Von März 1963 - Oktober 1964 angestellt bei der Stada, Standardpräparate Deutscher Apotheken eGmbH, im analytischen und Kontrollabor. Von Oktober 1964 - März 1967 unter der Leitung von Herrn Professor Dr. Dr. h.c.E. Bamann, Direktor des Instituts für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität München, mit der vorliegenden Dissertation beschäftigt. Seit Oktober 1964 Verwalterin einer wissenschaftlichen Assistentenstelle an diesem Institut.